



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS - CFM
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS EM CACHAÇA POR
MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA**

SILVANE MORÉS

ORIENTADOR
PROF. DR. LUIZ AUGUSTO DOS SANTOS MADUREIRA

Florianópolis, fevereiro de 2009.

Silvane Morés

**DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS EM BEBIDAS
DESTILADAS POR MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para obtenção do título de
Mestre em Química no **Programa de Pós-Graduação em
Química** da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 26 de fevereiro de 2009.

Prof. Dr. Ademir Neves
Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Vilma E. F. Heinzen

Prof. Dr. Luiz A. S. Madureira
Orientador

Prof. Dr. Eduardo Carasek

Prof. Dr. Josiel B. Domingos

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por abrir caminhos.

À minha mãe, Amélia, pelo amor, amizade e apoio. Ao meu pai, Euclides, que infelizmente não pôde ver o fim deste trabalho, mas que sem dúvida me acompanha em espírito. Saibam que estes são os verdadeiros responsáveis pelo meu sucesso.

Ao Prof. Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira, pela orientação e amizade.

Ao Edmar Martendal pela indiscutível colaboração.

Ao Renato Eising, pelo companheirismo, amizade e amor.

Aos meus amigos, todos.

Aos colegas dos laboratórios 214, 216 e 209, pela amizade e colaboração.

À banca examinadora, por terem aceitado o convite.

Aos professores e funcionários do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

À Universidade Federal de Santa Catarina.

À Capes pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| AGRADECIMENTOS | III |
| RESUMO..... | VI |
| ABSTRACT | VII |
| LISTA DE FIGURAS | VIII |
| LISTA DE TABELAS | X |
| ABREVIATURAS..... | XI |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Cachaça | 1 |
| 1.2 Determinação de voláteis | 5 |
| 1.2.1 Microextração em Fase Sólida | 5 |
| 1.2.1.1 Procedimento | 7 |
| 1.2.2 Fundamentos teóricos da SPME | 9 |
| 1.2.3 Variáveis que afetam o processo de SPME..... | 10 |
| 1.2.3.1 Etapa de extração | 10 |
| 1.2.4 Etapa de dessorção | 12 |
| 1.3 Otimização..... | 14 |
| 2. OBJETIVOS | 17 |
| 2.1 Objetivo Geral..... | 17 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 17 |
| 3. PARTE EXPERIMENTAL..... | 18 |
| 3.1 Instrumentação..... | 18 |
| 3.2 Reagentes | 19 |
| 3.3 Procedimento de extração..... | 19 |
| 3.4 Otimização multivariada | 19 |
| 3.5 Análise Sensorial..... | 20 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 22 |
| 4.1 Elaboração e otimização de métodos de análise de cachaças | 22 |
| 4.1.1 Ésteres..... | 22 |
| 4.1.2 Aldeídos..... | 30 |
| 4.1.3 Álcoois | 35 |
| 4.2 Qualificação dos componentes das cachaças e análise sensorial | 41 |
| 5. CONCLUSÕES | 44 |

| | |
|-------------------------------------|----|
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 46 |
| 7. ANEXOS | 49 |

RESUMO

Neste trabalho foi desenvolvida uma metodologia analítica para determinação de compostos voláteis, tais como ésteres, aldeídos e álcoois, em cachaças. A metodologia foi baseada na microextração em fase sólida, com separação e detecção por cromatografia a gás com detector por ionização em chama, sendo a extração realizada a partir do headspace da amostra. Os parâmetros que afetam a eficiência de extração dos analitos foram otimizados para obtenção da melhor sensibilidade. Para tanto, um planejamento fatorial em dois níveis com inclusão de um ponto central foi utilizado para verificação dos efeitos principais e de interação das variáveis sobre a resposta analítica. As variáveis concentração de sal (NaCl), temperatura de extração e tempo de extração foram avaliadas. A condição ótima para os ésteres foi obtida com: 0 g de sal, 20 minutos de extração a 25°C. Para os aldeídos: 1,25 g de sal, 20 minutos de extração a 10°C. Para os álcoois: 1,25 g de sal, 20 minutos de extração a 40°C. Foram construídas curvas de calibração externa para cada padrão investigado: propionato de pentila, acetato de hexila, heptanoato de etila, acetato de isobutila, caprato de etila, acetato de pentila, benzoato de etila, caprilato de etila, propionato de metila, butirato de propila, caproato de etila, acetato de etila, metanol, iso-butanol, butanol, 2-metil-butanol e eugenol. Os aldeídos não foram quantificados, pois houve evidência de reações entre os padrões e o etanol. O limite de detecção ficou na faixa de 0,4-75 $\mu\text{g L}^{-1}$, para ésteres e 0,11-31,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ para álcoois. Para este estudo foram analisadas diferentes marcas de cachaça e a faixa de concentração dos ésteres encontrada foi de 0-109,1 mg L^{-1} com recuperação média de 96,8% e a faixa encontrada para os álcoois foi de 0-273,1 mg L^{-1} com recuperação média de 94,3%.

Numa segunda parte deste trabalho, realizou-se uma investigação de todos os analitos que compõem as cachaças por meio da microextração em fase sólida aliada à cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Cerca de 70 compostos foram encontrados com maior frequência nas amostras de cachaça, destes 15 eram ésteres. Também foi realizada uma análise sensorial com alíquotas das bebidas estudadas a fim de se verificar o grau de aceitabilidade das mesmas.

ABSTRACT

In this work an analytical methodology for determination of volatile organic compounds such as esters, aldehydes and alcohol, in cachaças was developed. The method was based on the solid phase microextraction (SPME), with separation and detection by gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID). Parameters that affect the extraction efficiency of the analytes were optimized in order to obtain the best sensitivity. To reach this, a factorial planning in two levels with inclusion of a central point was used for verification of the main effect and interaction of the variables on the analytical reply. The variables concentration of salt, temperature of extraction and extraction time were evaluated. The excellent condition for esters was obtained with: 0 g of salt, 20 minutes of extraction at 25°C. For aldehydes: 1.25 g of salt, 20 minutes of extraction at 10°C. For the alcohol: 1.25 g of salt, 20 minutes of extraction at 40°C. Curves of external calibration for each investigated standard have been constructed: pentyl propionate, hexyl acetate, ethyl heptanoate, isobutyl acetate, ethyl caprate, pentyl acetate, ethyl benzoate, ethyl caprylate, methyl propionate, propyl burirate, ethyl caproate, ethyl acetate, methanol, iso-butanol, butanol, 2-methyl-butanol and eugenol. The aldehydes were not quantified due to evidence of reactions between these standards and ethanol. The detection limit ranged from 0.4 to 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ for esters and from 0.11 to 31.8 $\mu\text{g L}^{-1}$ for alcohols. Different marks of cachaça were analyzed and concentrations of esters were found to vary from 0 to 109.1 mg L^{-1} , with an average recovery of 96.8%. Concentrations of alcohols ranged from 0 to 273.1 mg L^{-1} , with an average recovery of 94.3%. Samples of cachaças were analysed by GC-MS to identify all the volatile compounds. By means of a sensorial analysis, the degree of acceptability of the alcoholic drinks was also investigated.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Dispositivo usado em SPME..... | 6 |
| Figura 2: Uso do amostrador de SPME para extração e dessorção de analitos para análise por GC..... | 8 |
| Figura 3: Classificação de fibras de SPME segundo o mecanismo de extração..... | 12 |
| Figura 4: Cromatograma da mistura dos 12 ésteres: acetato de etila (1), propionato de metila (2), acetato de isobutila (3), butirato de propila (4), acetato de pentila (5), caproato de etila (6), propionato de pentila (7), acetato de hexila (8), heptanoato de etila (9), caprilato de etila (10), caprato de etila (11) e benzoato de etila (12)..... | 24 |
| Figura 5: Gráfico de área total (somatório das áreas dos picos dos doze padrões de ésteres) versus tipo de fibra, PA (1), PDMS (2), CAR-PDMS (3) e PDMS-DVB (4)..... | 25 |
| Figura 6: Efeito da diluição, gráfico de área total de ésteres versus percentagem de etanol v/v. | 26 |
| Figura 7: Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial completo. Os efeitos que ultrapassam a linha de $p = 0,05$ são estatisticamente significativos sobre a resposta analítica com 95% de confiança. | 27 |
| Figura 8: Área total de aldeídos para cada fibra analisada. PDMS (1), PDMS-DVB (2), CAR-PDMS (3) e PA (4)..... | 31 |
| Figura 9: Efeito da diluição, gráfico de área total de aldeídos versus percentagem de etanol v/v. | 32 |
| Figura 10: Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial completo para os aldeídos. | 33 |
| Figura 11: Cromatograma de íons totais da mistura de aldeídos e alguns dos seus derivados: valeraldeído (1), paraldeído (2), propanaldietilacetil (3), furfural (4), benzaldeído (5), 5-metil-furfural (6), dietil acetil valeraldeído (7), parapropionaldeído (8) e dietil acetil 2-furfural (9)..... | 34 |
| Figura 12 - Formação de acetil pela reação de aldeído com etanol [35]..... | 35 |
| Figura 13 - Reação entre aldeídos [35]..... | 35 |
| Figura 14 - Cromatograma dos padrões de álcoois: metanol (1), iso-butanol (2), butanol (3), 2-metil-butanol (4) e eugenol (5). | 36 |
| Figura 15 - Área total de álcoois para as fibras analisadas: PDMS e PA..... | 37 |

| | |
|---|----|
| Figura 16 - Efeito da diluição, gráfico de área total de álcoois versus percentagem de etanol v/v. | 37 |
| Figura 17 - Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial completo para a mistura de álcoois..... | 38 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Limites de concentração de produtos secundários presentes na cachaça [4]..... | 3 |
| Tabela 2: Fibras comerciais para SPME. | 13 |
| Tabela 3: Matriz de um planejamento fatorial completo. | 20 |
| Tabela 4: Estruturas dos ésteres que compõem a mistura estudada..... | 23 |
| Tabela 5: Níveis estudados das variáveis do planejamento fatorial completo. | 26 |
| Tabela 6 - Figuras analíticas de mérito obtidas para a mistura de ésteres | 28 |
| Tabela 7 - Recuperações obtidas para a amostra de cachaça analisada | 29 |
| Tabela 8 - Concentrações dos ésteres encontradas em amostras de cachaças | 30 |
| Tabela 9: Estruturas dos aldeídos que compõem a mistura estudada..... | 31 |
| Tabela 10: Estruturas dos álcoois que compõem a mistura estudada. | 36 |
| Tabela 11 - Figuras analíticas de mérito obtidas para a mistura de álcoois..... | 39 |
| Tabela 12 - Recuperação da mistura de álcoois obtida para amostra de cachaça analisada | 39 |
| Tabela 13 - Concentrações de álcoois encontradas nas amostras de cachaças..... | 40 |
| Tabela 14: Compostos encontrados nas amostras de cachaças por GC-MS. | 42 |
| Tabela 15: Resultados da análise sensorial das cachaças. | 43 |

ABREVIATURAS

ABRABE: Associação Brasileira de Bebidas

SPME: microextração em fase sólida (do inglês solid phase microextraction)

SPE: extração em fase sólida (do inglês solid phase extraction)

GC: cromatografia gasosa (do inglês gas chromatography)

GC-MS: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (do inglês gas chromatography-mass spectrometry)

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês High-performance liquid chromatography)

LC-MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (do inglês liquid chromatography-mass spectrometry)

D/SPME: microextração por imersão direta

HS/SPME: microextração no headspace

n: mols de analito absorvido pela fibra

V_f : volume da fibra

V_s : volume da amostra

K_{fs} : coeficiente de partição (constante de distribuição)

C_o : concentração inicial

V_h : volume de headspace

K_{hs} : coeficiente de partição do analito entre amostra/headspace

PDMS: polidimetilsiloxano

PDMS/DVB: polidimetilsiloxano/divinilbenzeno

PA: poliacrilato

CAR/PDMS: carboxen/ polidimetilsiloxano

CW/DVB: carbowax/divinilbenzeno

CW/TPR: carbowax/templated resin

DVB/CAR/PDMS: divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano

LD: limite de detecção

R: coeficiente de correlação

RSD: desvio padrão relativo (do inglês relative standard deviation)

1. INTRODUÇÃO

As bebidas alcoólicas têm sido estudadas principalmente devido ao impacto social causado pelo consumo excessivo, embora vários produtos secundários presentes possam contribuir também para agravar a saúde pública por sua toxicidade. Esse agravamento aumenta com a falsificação ou adulteração das bebidas alcoólicas colocando em maior risco a saúde humana.

Por isso é importante o desenvolvimento de metodologias analíticas capazes de determinar os compostos voláteis e semi-voláteis em cachaça, e que apresentem maior sensibilidade, rapidez e minimização de resíduos quando comparadas aos métodos espectrofotométricos tradicionais.

1.1 Cachaça

Bebida alcoólica é definida como produto refrescante, aperitivo ou estimulante, destinado à ingestão humana no estado líquido, sem finalidade medicamentosa e contendo mais de meio grau Gay-Lussac de etanol [1].

O que caracteriza uma bebida alcoólica é o fato de ser obtida a partir da fermentação de fontes naturais próprias de açúcar e amiláceos tais como uva, milho, centeio, arroz, cana, cevada, aveia e mesmo de raízes e folhas. No processo de fermentação utilizam-se diferentes leveduras tais como *Saccharomyces cerevisiae*, como as do gênero *Kloeckera*, *Cândida*, *Hansenula*, *Hanseniopsis*, *Pichia*, *Zigossacharomyces*, entre outras. O crescimento dessas leveduras durante a fermentação é influenciado por diferentes fatores como pH, concentração de nitrogênio, açúcar, dióxido de enxofre, álcool e temperatura. Dependendo da bebida o processo de fermentação pode ocorrer em etapas e as leveduras do gênero *Kloeckera*, *Candida*, *Hanseniospora*, *Hansenula*, *Pichia*, *Zigossacharomyces* participam apenas do início da fermentação, produzindo compostos secundários que proporcionam aroma, que tem grande importância para os caracteres organolépticos da bebida [2]. A proporção harmônica dessas substâncias (compostos voláteis) que se formam durante a produção influencia na qualidade da bebida e são responsáveis pelas propriedades organolépticas, ou seja, aroma, gosto e sabor. Estes compostos podem chegar a centenas, dentre os quais se destacam os aldeídos, álcoois, ácidos

e ésteres, entre outros. A concentração desses compostos pode ser bastante variada, na ordem de mg L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$, como no caso de ésteres e ácidos graxos que são formados durante a fermentação, destilação, maturação e estão diretamente relacionados com a matéria prima utilizada [3].

No Brasil a principal e genuína bebida destilada denomina-se cachaça ou aguardente. A cachaça é por definição um produto alcoólico, com graduação alcoólica entre 38-54% em volume [4]. Atualmente a cachaça é a segunda bebida alcoólica mais consumida no Brasil perdendo apenas para a cerveja. É estimado que diariamente sejam consumidos setenta milhões de doses de 50mL [5]. Uma das razões que explicam a preferência brasileira pela aguardente de cana talvez seja histórica ou cultural, tendo em vista que o surgimento da bebida coincide com o próprio processo de colonização do Brasil, a partir da industrialização da cana-de-açúcar entre os séculos XVI e XVII. Outra razão para esta preferência pode residir no simples fato da cachaça possuir, em geral, baixo custo, o que explica a constante associação da bebida com a população de menor poder aquisitivo [6].

Segundo a Associação Brasileira de Bebidas [7] (ABRABE), estima-se que a produção nacional de cachaça encontra-se em torno de 1,5 bilhão de litros por ano. Isso corresponde a um consumo de 11 litros/habitante/ano. Esse destilado vem movimentando nesses últimos anos cerca de seis bilhões de dólares anuais, importância essa que tende a aumentar em virtude da recente denominação de origem que classificou a cachaça como sendo um produto típico do Brasil pelo Decreto nº. 4062 de 21/12/2001 [8].

Nos últimos anos a aguardente brasileira começou a marcar sua presença no mercado internacional sendo atualmente um dos destilados mais vendidos no mundo. Apesar do grande potencial de exportação, acredita-se que menos de 1% do total da produção anual de cachaça seja exportado por nossas indústrias [9].

A produção da cachaça é distribuída em 5 mil marcas, 30 mil produtores, gerando 450 mil empregos diretos e 1,3 milhões indiretos, de acordo com a ABRABE. Essa pulverização na produção da cachaça faz com que seu sabor, aroma e cor sejam os mais variados. Independente do tipo da bebida alcoólica, tão importante quanto à concentração de etanol, vem a ser a concentração de produtos secundários, que são regulamentados pela portaria nº 55 de 27 de julho de 2004 e a instrução normativa nº 13 de 29 de junho de 2005, de responsabilidade do Ministério da Agricultura e Abastecimento. Essa instrução normativa estabelece a composição

química e seus requisitos de qualidade para bebidas alcoólicas destiladas (Tabela 1) [4].

Tabela 1 - Limites de concentração de produtos secundários presentes na cachaça [4].

| Descrição | Máximo |
|---|--------|
| Acidez volátil, expressa em ácido acético em mg/100mL de álcool anidro | 150 |
| Ésteres totais, em acetato de etila, em mg/100mL de álcool anidro | 200 |
| Aldeídos totais, em acetaldeído, em mg/100mL de álcool anidro | 30 |
| Soma de Furfural e Hidroximetilfurfural, em mg/100mL de álcool anidro | 5 |
| Soma dos álcoois isobutílico (2-metil-propanol), isoamílicos (2-metil-1-butanol + 3-metil-1-butanol) e n-propílico (1-propanol), em mg/100mL de álcool anidro | 360 |
| Metanol, em mg/100mL de álcool anidro | 20 |

Os álcoois com mais de dois átomos de carbono formados durante o processo fermentativo são conhecidos como óleo fusel ou óleo de cana. Esses são provenientes, em grande parte, de reações de degradação de aminoácidos que ocorrem durante o processo de fermentação. Aplicando-se esse tipo de reação a certos aminoácidos, pode-se explicar a formação dos principais álcoois superiores, como o álcool d-amílico a partir da d-leucina, o álcool isoamílico a partir da l-leucina e o álcool iso-butílico a partir da valina, os quais apresentam odores característicos freqüentemente encontrados em bebidas [10].

Os aldeídos, principalmente o acetaldeído, são co-produtos normais da fermentação alcoólica. A formação de acetaldeído é resultado da ação de leveduras durante estágios preliminares do processo de fermentação. Os demais aldeídos são obtidos, provavelmente, a partir da oxidação de álcoois superiores provenientes da degradação de aminoácidos gerados pela hidrólise de proteínas. O furfural, um aldeído de presença rara em algumas cachaças, é resultante da decomposição química de carboidratos. É formado, principalmente, pela pirogenação da matéria orgânica depositada no fundo dos alambiques. Nas cachaças envelhecidas, o furfural pode ser oriundo da ação de ácidos sobre as pentoses e seus polímeros (hemiceluloses). Esse composto pode estar presente no caldo de cana, quando a colheita da cana-de-açúcar for precedida da queima do palhiço [8].

O acetato de etila, principal éster encontrado na cachaça, quando presente em pequenas porções, proporciona um aroma agradável de frutas na cachaça e é

obtido pela reação entre pequenas quantidades de etanol e ácido acético, provenientes do processo de fermentação [8, 11].

No Brasil, existem poucos estudos sobre a qualidade da aguardente de cana de açúcar, porém devido às exigências do mercado externo, cresce a preocupação com a qualidade do produto. Estudos relacionados com a aguardente de cana se fazem tão necessários quanto urgentes, considerando-se por um lado a crescente exigência do mercado externo se quisermos aumentar sua exportação, e por outro, a necessidade de investirmos na sua qualidade e assim resgatar a importância dessa bebida tipicamente brasileira [12].

A presença, constituição e composição de substâncias voláteis em alimentos têm uma influência substancial em sua qualidade. Para o consumidor, por sua vez, a qualidade organoléptica é igualmente importante e decisiva na hora da compra [13]. Embora os maiores componentes da cachaça sejam a água e o etanol, essa bebida pode ser constituída de diversas substâncias, as quais são responsáveis em grande parte pelas propriedades organolépticas da cachaça [5].

Vários métodos analíticos foram desenvolvidos para a determinação dos componentes do *flavor* em bebidas destiladas. Esses métodos incluem extração com solventes, destilação/extração simultâneas, *purge-and-trap*, combinação de extração com solvente e *purge-and-trap* e injeção direta [14].

Uma alternativa moderna à tecnologia tradicional da preparação da amostra é a microextração em fase sólida (em inglês *solid-phase microextraction*, SPME). Esta técnica é um método da extração desenvolvido por Pawliszyn e colaboradores em 1989. Elimina o uso de solventes (tóxicos) orgânicos, e diminui substancialmente o tempo de análise ao permitir uma automatização conveniente da preparação da amostra. SPME pode integrar a amostragem, a extração, a concentração e a introdução da amostra em um único processo ininterrupto. Suas características importantes são simplicidade, custo baixo, rapidez, seletividade e sensibilidade quando combinadas com as modalidades apropriadas de detecção. Um dos aspectos críticos na otimização de SPME é a seleção da fibra apropriada. SPME é usado como um estágio prévio da preparação da amostra, não somente na cromatografia a gás, mas na cromatografia líquida e na eletroforese capilar [15].

1.2 Determinação de voláteis

Os aromas são essenciais para a avaliação da qualidade dos produtos frescos e processados. A determinação dos compostos voláteis em análise de alimentos e bebidas encontra dificuldades devido a necessidade de se determinar uma diversidade de compostos em concentrações baixas e de características físico-químicas distintas.

Pela condição volátil dos aromas, o instrumento analítico que se requer para a sua separação e determinação é um cromatógrafo a gás. Não obstante, as outras técnicas se distinguem pela preparação da amostra, a extração e a concentração dos analitos, etapas prévias a cromatografia a gás, e que repercutem na reprodutibilidade e precisão.

Classicamente a extração de aromas se dá por meio de métodos laboriosos e caros, como a extração líquido-líquido, a extração sólido-líquido e a destilação a vácuo.

A extração líquido-líquido compreende várias fases que habitualmente provocam perdas de analitos durante o processo. Frequentemente, a manipulação durante a análise é a maior fonte de erros. Posteriormente e para minimizar a quantidade de solvente a ser empregada, se desenvolveu a extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction*, SPE), que usa um material sorvente para extrair compostos orgânicos de amostras aquosas. Ambas as técnicas requerem uma fase posterior de concentração para eliminar o excesso de solvente, pelo que se limitam a compostos voláteis e semi-voláteis com pontos de ebulição superiores a temperatura de dessorção do solvente [16, 17].

1.2.1 Microextração em Fase Sólida

Pawliszyn e colaboradores desenvolveram no final dos anos oitenta a Microextração em Fase Sólida, inicialmente usada para a determinação de compostos clorados em águas contaminadas [18]. Esta técnica de preparação de amostra extrai e concentra os analitos diretamente em uma fibra ou fase estacionária que inclui um tipo ou mais de polímeros extratores [17-19]. O método é rápido, fácil de aplicar, de baixo custo e respeita o meio ambiente, já que não usa nenhum tipo de solvente orgânico. Emprega-se combinado com cromatografia a gás (GC) e cromatografia a gás acoplada a detector de espectrometria de massas (GC-MS) e é

aplicado a um amplo grupo de compostos voláteis e semi-voláteis em amostras biológicas, ambientais e de alimentos. A SPME também tem sido empregada junto à cromatografia líquida (HPLC) e cromatografia líquida-massas (LC-MS) para analisar compostos pouco voláteis [20].

A técnica de SPME se baseia na extração dos analitos de uma matriz mediante uma fibra de sílica fundida recoberta por um sorvente quase sempre polimérico. O pequeno tamanho da fibra e sua geometria cilíndrica permitem incorporá-la a uma seringa. Desta forma se facilita a manipulação e se protege a fibra quando esta não é utilizada (Figura 1) [17].

As principais vantagens da técnica de SPME são [16, 21]:

- Simplicidade;
- Baixo custo;
- Utiliza pequenos volumes de amostra;
- Não necessita solventes orgânicos;
- Útil para todo tipo de amostra: gasosa, líquida e sólida.
- Possibilidade de automação;
- Permite a concentração de compostos voláteis e semi-voláteis;
- O limite de detecção pode ser relativamente baixo (na ordem de ppt) o que

mostra a sensibilidade da técnica.

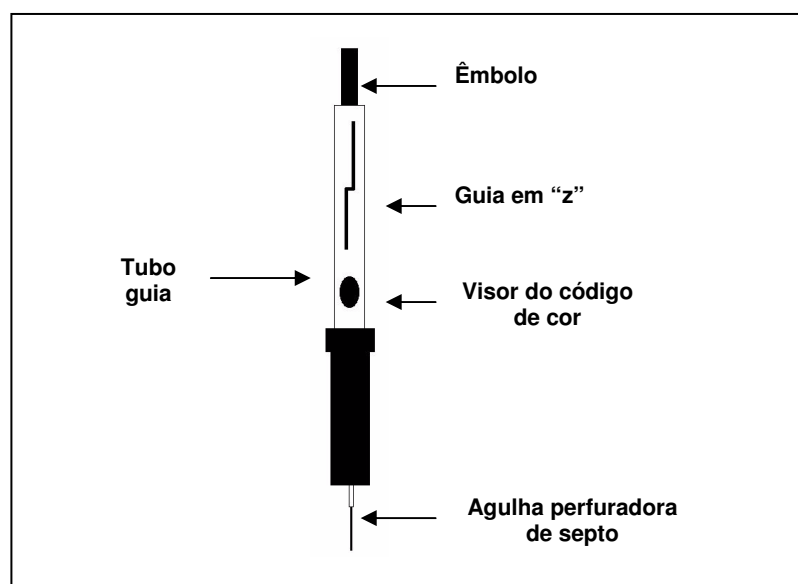


Figura 1: Dispositivo usado em SPME.

E as principais desvantagens são [16]:

- Limitada capacidade das fibras devido conterem uma quantidade de recobrimento muito pequena;
- Compostos de elevado massa molecular podem sorver irreversivelmente na fibra alterando suas propriedades;
- A formação de bolhas de gás na superfície da fibra pode afetar a taxa de transferência de massa;
- A sensibilidade da técnica depende da quantidade de analitos extraídos da amostra. Se o volume da amostra é muito elevado, será demasiado superior ao produto entre a constante de distribuição e o volume de recobrimento da fibra, portanto, quando se aumenta o volume da amostra não se consegue aumentar a sensibilidade.

1.2.1.1 Procedimento

O procedimento de SPME consta de duas etapas principais: uma etapa de extração e uma de dessorção.

Na etapa de extração ocorre a migração dos analitos da amostra para a fibra até que uma situação de equilíbrio. Este processo de extração pode ser por adsorção ou absorção em função do tipo de fibra utilizado. Para o processo de extração com SPME, coloca-se um volume de amostra em um *vial* hermeticamente fechado com um septo de silicone ou teflon. Em seqüência, como mostrado na Figura 2 [22], o septo é perfurado e se introduz a seringa no *vial* (a). Empurrando o êmbolo se expõe a fibra na amostra em tempo previamente estabelecido (b). Uma vez finalizado o tempo de extração, a fibra é recolhida ao interior da seringa (c) que é retirada do septo e levada para inserção no cromatógrafo. Com a fibra retraída, o septo do injetor é perfurado, a fibra é exposta para dessorção (d), terminada a dessorção, a fibra é novamente recolhida (e) [22].

Há três formas de se realizar a extração utilizando SPME [21]:

I - Extração por **imersão direta** da fibra na amostra (DISPME).

II - Extração no **headspace** (HS/SPME). Neste caso, a fibra é exposta na fase gasosa, dentro do *vial*, a cima da amostra. Os analitos passam para a fase gasosa em função de suas pressões de vapor.

III - Extração com **proteção de membrana**. Coloca-se uma membrana semipermeável ao redor da fibra, protegendo-a dos compostos de elevado peso molecular.

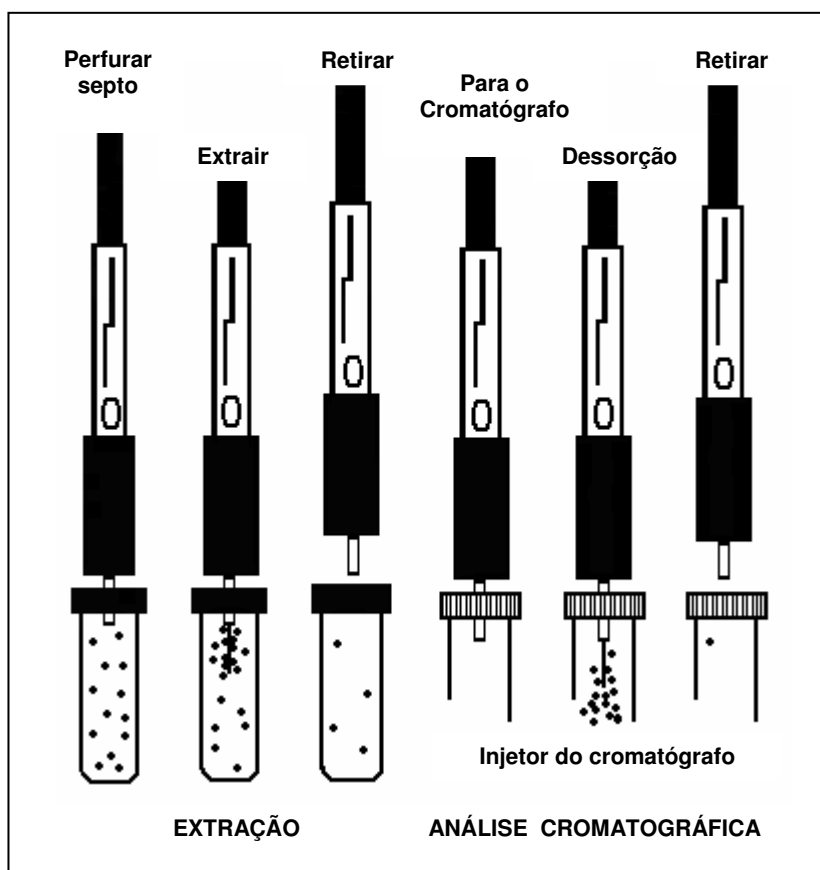


Figura 2: Uso do amostrador de SPME para extração e dessorção de analitos para análise por GC.

Na etapa de dessorção os analitos são liberados da fibra, e existem duas maneiras para tanto [23]:

I - Por **dessorção térmica**. Quando se acopla SPME a um cromatógrafo a gás. A fibra é inserida no injetor que se encontra em temperatura suficientemente alta para que, rapidamente, ocorra a dessorção dos analitos.

II - Por **adição de solvente orgânico**. Muitas vezes esta é a técnica utilizada quando se acopla SPME a cromatografia líquida, pois permite que a dessorção se realize com a própria fase móvel. Também é usada quando o analito não é suficientemente volátil para que ocorra a dessorção térmica.

1.2.2 Fundamentos teóricos da SPME

A SPME se baseia fundamentalmente na partição dos analitos entre a matriz da amostra e o recobrimento da fibra [23]. Assim o transporte dos analitos, desde a matriz da amostra até a fibra, começa quando a fibra entra em contato com a amostra. A extração se considera completa quando a concentração do analito alcança o equilíbrio de distribuição entre a matriz da amostra e o recobrimento da fibra [21]. O que, na prática, significa que, uma vez alcançado o equilíbrio, a quantidade extraída é constante e, portanto, será independente de um aumento do tempo de extração. O modelo matemático que explica a dinâmica do processo de sorção quando a fibra é introduzida diretamente na amostra foi descrito por [24].

Este modelo confirma a relação linear que existe entre a quantidade de analito absorvida pela fibra no estado de equilíbrio (n) e a concentração deste na amostra (C_o), Equação 1.

$$n = \frac{K_{fs} V_f C_o V_s}{K_{fs} V_f + V_s}$$

Equação 1

n = mols de analito absorvido pela fibra

V_f = volume da fibra

V_s = volume da amostra

K_{fs} = coeficiente de partição (constante de distribuição) do analito entre fibra/amostra: $K_{fs} = C_f / C_s$

C_o = concentração inicial de analito na amostra

Assume-se que a matriz da amostra é uma única fase homogênea e não se considera o efeito do *headspace*. O modelo matemático que explica a dinâmica do processo de absorção quando a fibra se expõe ao *headspace* é mostrado na Equação 2.

$$n = \frac{K_{fs} V_f C_o V_s}{K_{fs} V_f + K_{hs} V_h + V_s}$$

Equação 2

V_h = volume de *headspace*

K_{hs} = coeficiente de partição do analito entre amostra/*headspace*: $K_{hs} = C_h/C_s$

1.2.3 Variáveis que afetam o processo de SPME

1.2.3.1 Etapa de extração

Os parâmetros que podem afetar o processo de absorção/adsorção são:

- **Tempo de extração** [23]: ao utilizar a SPME, deve-se determinar o tempo necessário para alcançar o estado de equilíbrio (onde a quantidade de analito que se extrai se mantém constante). Quando se analisa a fração volátil e semi-volátil de uma amostra com mais de um analito de interesse, o tempo para que estes analitos alcancem o equilíbrio pode ser distinto. Geralmente, nestes casos se fixa um tempo de extração de compromisso, o que torna muito importante o controle do tempo de extração em benefício da repetibilidade, já que pequenas oscilações podem variar consideravelmente a quantidade de analito extraída.

- **Temperatura de extração**: Este parâmetro contribui de duas formas distintas em SPME [23]:

- I - No modo de imersão, os coeficientes de difusão dos analitos na amostra aumentam ao se elevar a temperatura, assim há um ganho na quantidade de analito extraída.

- II - No modo *headspace*, um incremento na temperatura aumenta a concentração dos analitos no *headspace*, assim a extração é mais rápida, já que se necessita menos tempo para alcançar o equilíbrio. Por outro lado, reduz-se a eficácia da extração, pois um aumento da temperatura diminui os coeficientes de partição do analito entre o *headspace* e a fibra, portanto, diminui a quantidade de analito extraída pela fibra no equilíbrio.

- **Presença de sais na amostra** [23]: Geralmente a presença de eletrólitos em um sistema de adsorção, diminui a solubilidade dos compostos hidrofóbicos na fase aquosa, este efeito se chama *salting out* e se utiliza para incrementar a sensibilidade do método analítico. Os sais aumentam o coeficiente de distribuição dos analitos que estão presentes em forma neutra (não dissociada), o que aumenta a quantidade de analito extraída. Mas se os analitos se encontram em forma

dissociada, se observa uma diminuição da eficácia da extração devido, provavelmente, a um aumento do coeficiente de atividade das espécies iônicas ao se aumentar a força iônica da solução.

- **pH da amostra:** Este fator está relacionado com o item anterior, já que os analitos devem estar majoritariamente presentes em sua forma neutra para favorecer sua extração.

- **Volume da amostra:** O volume deve ser selecionado em função dos coeficientes de distribuição dos analitos, K_{fs} . Ao se aumentar o volume da amostra aumenta também a quantidade de analito extraída.

Nas condições de trabalho de SPME normalmente o volume de amostra (V_s) é muito maior que o coeficiente de partição do analito entre a fibra e a amostra (K_{fs}) pelo volume da fibra (V_f). Isto se deve ao fato de que o volume da fibra é muito menor que o volume da amostra, assim a Equação 1 pode ser resumida a Equação 3:

$$n = K_{fs} V_f C_o$$

Equação 3

Esta equação mostra que a quantidade de analito extraída (n) é diretamente proporcional a concentração de analito na amostra e independente do volume da amostra.

- **Solventes orgânicos:** Em amostras aquosas a quantidade de analito extraída é diminuída, já que aumenta a solubilidade dos analitos [25]. Esta redução da quantidade de analito extraído também está associada à competição entre os analitos e o solvente orgânico pela fibra de SPME [26].

- **Agitação da amostra:** Para aumentar a velocidade da extração se faz necessário utilizar um sistema de agitação para [27]:

- Facilitar a difusão dos analitos até a superfície da fibra.
- Diminuir o efeito de redução da velocidade de extração causada pela zona estática que se forma ao redor da fibra.
- Compensar os baixos coeficientes de difusão das matrizes líquidas.

A agitação pode ser feita com o auxílio de barras magnéticas, movimento do *vial* ou da fibra, fluxo da amostra através da fibra e, ainda, por ultra-som.

- **Tipo de fase**[23]: A eficácia da extração depende da constante de distribuição (K_{fs}) que é característica de cada par analito/fibra.

As fibras comerciais podem ser classificadas segundo o processo de extração que se produz, geralmente, por absorção ou adsorção (Figura 3)[23]. Algumas fibras comerciais e suas características se encontram na Tabela 2:

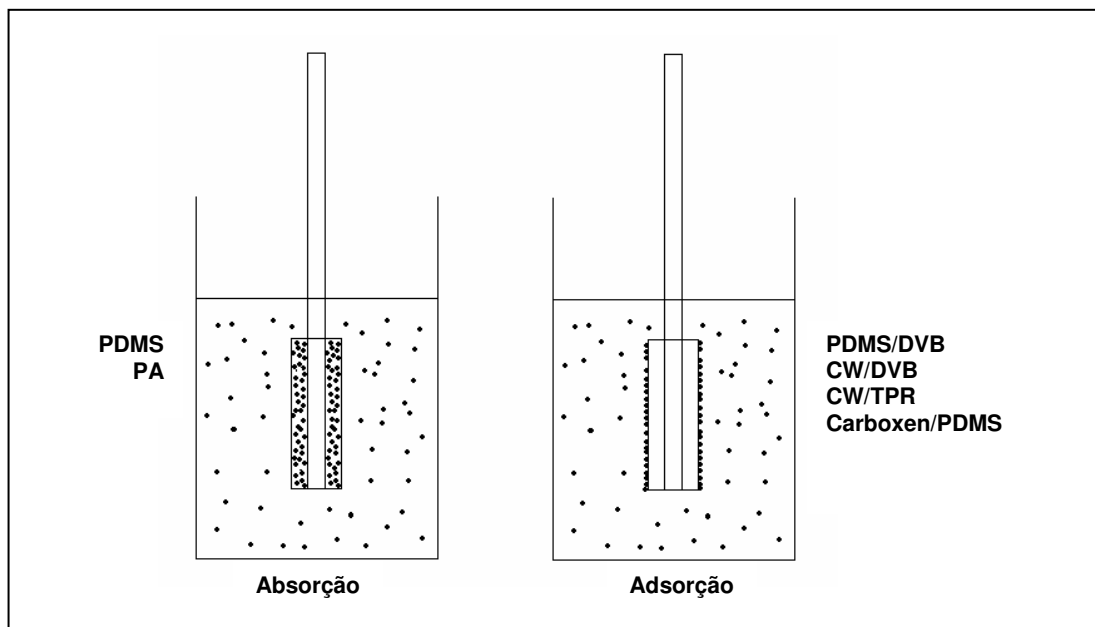


Figura 3: Classificação de fibras de SPME segundo o mecanismo de extração.

1.2.4 Etapa de dessorção

A dessorção térmica dos analitos no injetor de um cromatógrafo a gás depende da volatilidade dos analitos, da posição da fibra no injetor e do tempo de exposição. À medida que se aumenta a temperatura, os coeficientes de partição fibra/gás carreador diminuem e, assim, diminui rapidamente a capacidade da fibra em reter os analitos.

- **Temperatura de dessorção** [23]: geralmente se recomenda o uso da temperatura máxima recomendada pelo fabricante da fibra. Ao se aumentar a temperatura, a afinidade dos compostos pela fibra diminui, então ocorre a dessorção.

Tabela 2: Fibras comerciais para SPME.

| Fase estacionária | Espessura | Temperatura máx. de uso | Processo de extração | Polaridade |
|--|---|------------------------------------|---------------------------------|-------------------|
| PDMS (polidimetilsiloxano) | 100 µm, fase não ligada | 280 °C | absorção | apolar |
| | 30 µm, fase não ligada | 280 °C | absorção | apolar |
| | 7 µm, fase ligada | 340 °C | absorção | apolar |
| PDMS/DVB (PDMS/divinilbenze- no) | 65 µm, fase parcialmente entrecruzada | 270 °C | adsorção | bipolar |
| | 60 µm, fase parcialmente entrecruzada | - | adsorção | bipolar |
| | 65 µm, fase fortemente entrecruzada ¹ | 270 °C | adsorção | bipolar |
| PA (poliacrilato) | 85 µm, fase parcialmente entrecruzada | 320 °C | absorção | polar |
| CAR/PDMS (carboxen/PDMS) | 75 µm, fase parcialmente entrecruzada | 320 °C | adsorção | bipolar |
| | 85 µm, fase fortemente entrecruzada ¹ | 320 °C | adsorção | bipolar |
| CW/DVB (carbowax/DVB) | 65 µm, fase parcialmente entrecruzada | 265 °C | adsorção | polar |
| | 70 µm, fase fortemente entrecruzada ¹ | 265 °C | adsorção | polar |
| CW/TPR (CW/templated resin) | 50 µm, fase parcialmente entrecruzada | - | adsorção | polar |
| DVB/CAR/PDMS | 50/30 µm, fase fortemente entrecruzada ¹ | 270 °C | adsorção | bipolar |
| | 50/30 µm, fase fortemente entrecruzada ¹ | 270 °C | adsorção | bipolar |

¹ Fibras Stableflex, com sílica fundida flexível.

Através da Equação 4, observa-se que os coeficientes de partição diminuem linearmente com o aumento da temperatura:

$$\log K_{fs} = a \left(1/T \right) + b$$

Equação 4

K_{fs} = coeficiente de partição entre a fibra e a amostra líquida;

a e b = constantes;

T = temperatura.

- **Tempo de dessorção:** deve ser o suficiente para que ocorra toda a dessorção dos analitos, evitando-se restos na fibra.
- **Diâmetro do *liner*:** o *liner* deve ter o diâmetro o mais similar possível ao da fibra para assegurar uma transferência rápida do analito à coluna
- **Posição da fibra no injetor** [23]: a fibra deve situar-se ao centro do injetor (do *liner*) durante toda a dessorção, para que se tenha um aquecimento rápido e reprodutível.

1.3 Otimização

1.3.1 Quimiometria

A quimiometria pode ser definida como a área da química que usa métodos matemáticos e estatísticos para planejar ou selecionar procedimentos ótimos de medidas e experimentos, bem como, extrair o máximo da informação química relevante, com a análise dos dados. Engloba todo um processo onde os dados são transformados em informações usadas para tomar todas as possíveis decisões [28].

Portanto, a quimiometria é uma ferramenta que poderá ser usada tanto nos procedimentos pré-analíticos como nos pós-analíticos.

1.3.2 Otimização multivariada

As metodologias de otimização utilizada em química analítica são usualmente baseadas em procedimentos univariados. Apesar da interpretação dos resultados obtidos ser fácil, as interações entre as variáveis não são detectadas.

Conseqüentemente, um falso valor de máximo pode ser obtido, ou seja, certa condição na qual a combinação das variáveis não é a que provê a melhor resposta analítica [29]. Nesta metodologia, uma variável é otimizada de cada vez, desta forma, requer um grande número de experimentos, grande quantidade de reagentes e de tempo.

Uma das ferramentas multivariadas mais utilizadas é o planejamento fatorial completo em dois níveis. Este é usado para verificar a significância preliminar das variáveis sobre a resposta no sistema em estudo. Neste procedimento, os efeitos principais e de interação das variáveis no intervalo estudado são estimados. Esta é uma das maiores vantagens da otimização multivariada comparada a univariada. Outra vantagem é que o número de experimentos é consideravelmente reduzido, uma vez que somente dois níveis de cada variável são avaliados [29, 30].

1.3.3 Planejamento Fatorial Completo

O planejamento fatorial completo é uma das técnicas quimiométricas mais frequentemente aplicadas em otimização multivariada. É aplicado para investigar as influências de todas as variáveis e os efeitos de interação entre elas sobre a resposta analítica.

Num planejamento fatorial, cada variável é denominada de fator, e cada fator varia em dois níveis ou mais. O número de experimentos é calculado como $n = 2^k$, onde k é o número de variáveis [30]. Embora o planejamento fatorial completo não indique os valores ótimos para as variáveis, ele é importante para a análise dos efeitos individuais e suas interações. Uma desvantagem deste planejamento é que o número de experimentos aumenta bastante com o aumento dos fatores a serem avaliados.

O planejamento fatorial completo em dois níveis é usado para estimar os efeitos principais e os efeitos das interações entre as variáveis em estudo sobre uma resposta analítica. Os níveis costumam ser denotados pelos sinais de (+), para superior e de (-), para inferior. Pontos centrais, nos quais todas as variáveis assumem valores médios, devem ser incluídos para evitar o risco da perda da relação não linear no meio do planejamento e para determinar o intervalo de confiança pelas repetições submetidas [31]. Este planejamento é utilizado como etapa preliminar em otimização de procedimentos analíticos, para indicar se as variáveis envolvidas afetam ou não a resposta.

O valor da probabilidade estatística, p , indica quando o efeito é estatisticamente significativo. Os principais efeitos, bem como as interações entre as variáveis, podem ser avaliados analisando o gráfico de Pareto, que se apresenta em barras horizontais, correspondentes aos valores absolutos dos efeitos estimados, sendo seccionado por linha vertical correspondente a um intervalo de confiança, geralmente de 95% ($p = 0,05$). Efeitos que ultrapassam esta linha de referência devem ser considerados como significativos sobre a resposta analítica. O efeito principal pode ser expresso como a diferença entre a resposta média no nível superior e a resposta média no nível inferior, podendo assumir valor positivo, indicando aumento da resposta analítica quando há deslocamento do nível inferior para o superior, ou negativo, indicando diminuição para a resposta analítica quando há deslocamento do nível inferior para superior [32].

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar o teor de compostos voláteis (álcoois, aldeídos e ésteres) presentes em cachaça através da técnica de microextração em fase sólida acoplada a cromatógrafo a gás.

2.2 Objetivos específicos

- Aplicar a técnica de microextração em fase sólida a partir do *headspace* das amostras para determinar compostos voláteis em cachaça utilizando cromatografia a gás como método de separação;
- Comparar a eficiência de quatro diferentes tipos de fibras para microextração em fase sólida dos compostos voláteis das cachaças;
- Utilizar planejamento fatorial completo para a otimização dos parâmetros que afetam a eficiência de extração;
- Validar a metodologia, através da obtenção dos parâmetros analíticos de mérito, como limites de detecção e quantificação e faixa de trabalho;
- Determinar a composição em termos de compostos voláteis de amostras de cachaça;
- Quantificar os compostos voláteis presentes nas amostras de cachaça, comparando os resultados, quando possível, com as especificações do Ministério da Agricultura.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Instrumentação

Todas as análises cromatográficas foram feitas em um cromatógrafo a gás Shimadzu GC-2014, equipado com injetor do tipo split/splitless e detector por ionização em chama (FID). Colunas capilares DB-Wax *J & W Scientific* (USA), para análise de ésteres e Rtx-5MS *Restec* (USA), para análise de álcoois e aldeídos, ambas com 30 metros de comprimento, 0,25 milímetros de diâmetro interno e 0,25 micrômetros de espessura de fase estacionária foram utilizadas para as separações cromatográficas. Gás nitrogênio *White Martins* (São Paulo, Brasil) foi utilizado como gás carreador com vazão de 1,21 mL min⁻¹. As temperaturas do injetor e detector foram fixadas em 270 °C e 280 °C, respectivamente e o programa de temperatura do forno da coluna foi: 35 °C (3 min), 5 °C/min até 150 °C, 15 °C/min até 270 °C (1 min) quando utilizada coluna Rtx-5MS. E quando utilizada a coluna DB-Wax, as temperaturas do injetor e detector foram 240 °C e 250 °C, respectivamente e o programa de temperatura foi: 40 °C (2 min), 5 °C/min até 150 °C (1 min).

Também foram feitas análises em um cromatógrafo a gás Shimadzu GC-2010, equipado com injetor do tipo split/splitless e detector de massas. Coluna capilar Rtx-5MS *Restec* (USA), com 30 m, 0,25 mm de d.i. e 0,25 µm de espessura de fase estacionária. As análises foram feitas no modo varredura total (15 a 400 u) e com elétron ionização (70 eV). As condições cromatográficas utilizadas foram: temperaturas do injetor e interface fixadas em 270 °C e o programa de temperatura do forno da coluna foi: 35 °C (3 min), 5 °C/min até 150 °C, 15 °C/min até 270 °C (1 min) e gás Hélio *White Martins* (São Paulo, Brasil) foi utilizado como gás carreador com vazão de 1,21 mL min⁻¹.

Banho termostatizado *MicroQuímica* (Palhoça, Brasil) e agitador magnético *DIST* (Florianópolis, Brasil) foram utilizados para estabilização da temperatura e agitação das amostras. Para o procedimento de microextração foi utilizado um *holder Supelco* (Taufkirchen, Alemanha) e fibras de PA (85µm), PDMS (100µm), PDMS-DVB (65µm) e Car-PDMS (75µm), ambas *Supelco* (Taufkirchen, Alemanha).

3.2 Reagentes

Padrões de ésteres: propionato de pentila, acetato de hexila, heptanoato de etila, acetato de isobutila, caprato de etila, acetato de pentila, benzoato de etila, caprilato de etila, propionato de metila, butirato de propila, caproato de etila e acetato de etila, todos *Sigma-Aldrich* (Taufkirchen, Alemanha).

Padrões de aldeídos: furfural, benzaldeído, acetaldeído, valeraldeído e 5-metil-furfural, todos *Sigma-Aldrich* (Taufkirchen, Alemanha).

Padrões de álcoois: metanol, butanol, iso-butanol, 2-metil-butanol, pentanol e eugenol, todos *Sigma-Aldrich* (Taufkirchen, Alemanha).

Cloreto de sódio *Merck* (Darmstadt, Alemanha) foi utilizado para modificação da força iônica das soluções de trabalho e amostras, quando necessário.

Etanol grau HPLC *J.T. Baker* (México) foi utilizado na preparação das soluções estoque dos padrões e nas soluções de trabalho (soluções simuladoras de cachaça, com 40% v/v).

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água destilada e deionizada (18 MΩcm), sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

3.3 Procedimento de extração

Alíquotas de 8 mL de amostras foram transferidas para um *vial* com capacidade para 15 mL *Supelco* (Taufkirchen, Alemanha) e submetidas a agitação com o auxílio de barra magnética. Com a seringa perfurou-se o septo dos frascos contendo as amostras e a fibra foi exposta nos seus *headspace*, ainda sob agitação, controlando-se o tempo de extração. As amostras foram estabilizadas por 5 minutos na temperatura desejada. Após a extração a fibra foi recolhida e levada ao cromatógrafo.

3.4 Otimização multivariada

Para a otimização multivariada foi levado em consideração a média geométrica das áreas dos picos dos analitos, já que foram analisados simultaneamente, nos seus grupos (mistura de aldeídos, mistura de álcoois e mistura de ésteres).

As variáveis tempo e temperatura de extração e efeito *salting-out* foram otimizadas por meio de um planejamento fatorial completo em dois níveis com inclusão de um ponto central. Os níveis estudados de cada variável foram: 10 e 40 °C para temperatura, 10 e 20 minutos para o tempo de extração e massa de NaCl de 0 e 1,25 g. A matriz do planejamento fatorial completo é mostrada na Tabela 3. O ponto central foi feito em quadruplicata, para que se pudesse avaliar a perda de linearidade entre os níveis escolhidos. Todos os dados obtidos nesta etapa foram processados pelo software Statistica 6.0 e a concentração dos analitos foi mantida constante (10 mg L⁻¹).

Os resultados obtidos com este planejamento foram expressos por gráfico de Pareto e, assim, condições ótimas puderam ser encontradas.

Tabela 3: Matriz de um planejamento fatorial completo.

| Experimento | Variável 1 | Variável 2 | Variável 3 |
|-------------|------------|------------|------------|
| 1 | -1 | -1 | -1 |
| 2 | -1 | -1 | 1 |
| 3 | -1 | 1 | -1 |
| 4 | -1 | 1 | 1 |
| 5 | 1 | -1 | -1 |
| 6 | 1 | -1 | 1 |
| 7 | 1 | 1 | -1 |
| 8 | 1 | 1 | 1 |
| 9 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 0 | 0 | 0 |

3.5 Análise Sensorial

A análise sensorial das amostras foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial, do Departamento de Química, no *Campus* II da Universidade Regional de Blumenau (FURB). As amostras foram servidas em copinhos próprios transparentes e identificadas através de códigos.

O atributo sensorial verificado foi apenas o aroma, para evitar o consumo de bebida alcoólica em ambiente escolar.

Para verificar a preferência dos diferentes tipos de cachaça pela população geral, os 200 degustadores foram consumidores comuns, não treinados, com idade superior a 18 anos. Cada degustador recebeu uma ficha de análise sensorial em que preencheu os códigos e as respectivas notas para cada amostra.

O teste aplicado foi o de Escala Hedônica de nove pontos, que varia de “desgostei muitíssimo” (1) a “gostei muitíssimo” (9)[33]. Calculou-se o índice de aceitabilidade, sendo a nota máxima correspondente a 100% de aceitabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Elaboração e otimização de métodos de análise de cachaças

Para a elaboração e otimização de um método de análise de cachaças, primeiramente estudou-se o tipo de fibra que melhor extraiu os analitos para cada grupo de compostos voláteis e semi-voláteis das amostras. Para tanto, levou-se em conta o somatório das áreas dos picos dos compostos, como um compromisso entre as áreas dos picos, ao invés de levar-se em conta cada resposta individualmente, já que se utilizou misturas de compostos (mistura de ésteres, mistura de aldeídos e mistura de álcoois).

Também se observou o efeito da diluição da amostra ou o efeito do solvente em amostras sintéticas (água, etanol e a mistura de um dos grupos de compostos). Como as amostras de cachaças analisadas tinham cerca de 40% v/v de etanol, foram estudadas as proporções em volume de etanol: 40%, 30%, 20% e 10%. E para que a simulação da diluição fosse completa, a concentração dos analitos também foi diminuída proporcionalmente a percentagem de etanol: 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, 150 $\mu\text{g L}^{-1}$, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$.

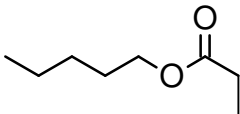
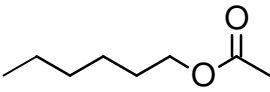
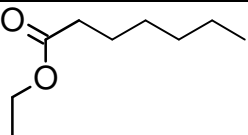
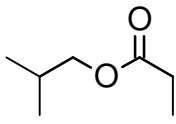
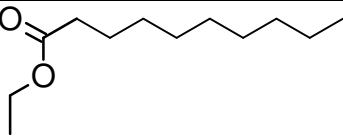
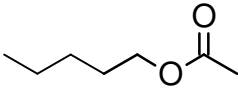
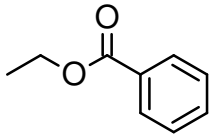
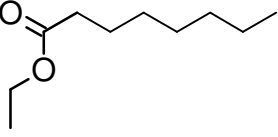
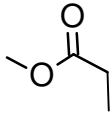
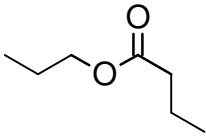
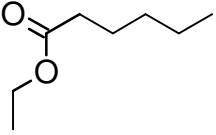
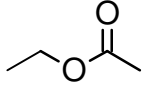
Com uma fibra e a proporção de etanol escolhidas, fez-se um planejamento fatorial completo que integrou as variáveis: tempo de extração dos analitos, temperatura de extração dos analitos e massa de sal (efeito *salting-out*). Para cada grupo de compostos foi feito um planejamento separado.

Já otimizadas todas as variáveis, construí-se uma curva de calibração e então foram analisadas as cachaças quantitativamente.

4.1.1 Ésteres

Uma mistura de 12 ésteres foi estudada: propionato de pentila, acetato de hexila, heptanoato de etila, acetato de isobutila, caprato de etila, acetato de pentila, benzoato de etila, caprilato de etila, propionato de metila, butirato de propila, caproato de etila e acetato de etila. Estes ésteres estão representados pelas estrutura contidas na Tabela 4 . A Figura 4 mostra o cromatograma da mistura de padrões de ésteres.

Tabela 4: Estruturas dos ésteres que compõem a mistura estudada.

| | |
|---|---|
|  |  |
| Propionato de pentila | Acetato de hexila |
|  |  |
| Heptanoato de etila | Acetato de isobutila |
|  |  |
| Caprato de etila | Acetato de pentila |
|  |  |
| Benzoato de etila | Caprilato de etila |
|  |  |
| Propionato de metila | Butirato de propila |
|  |  |
| Caproato de etila | Acetato de etila |

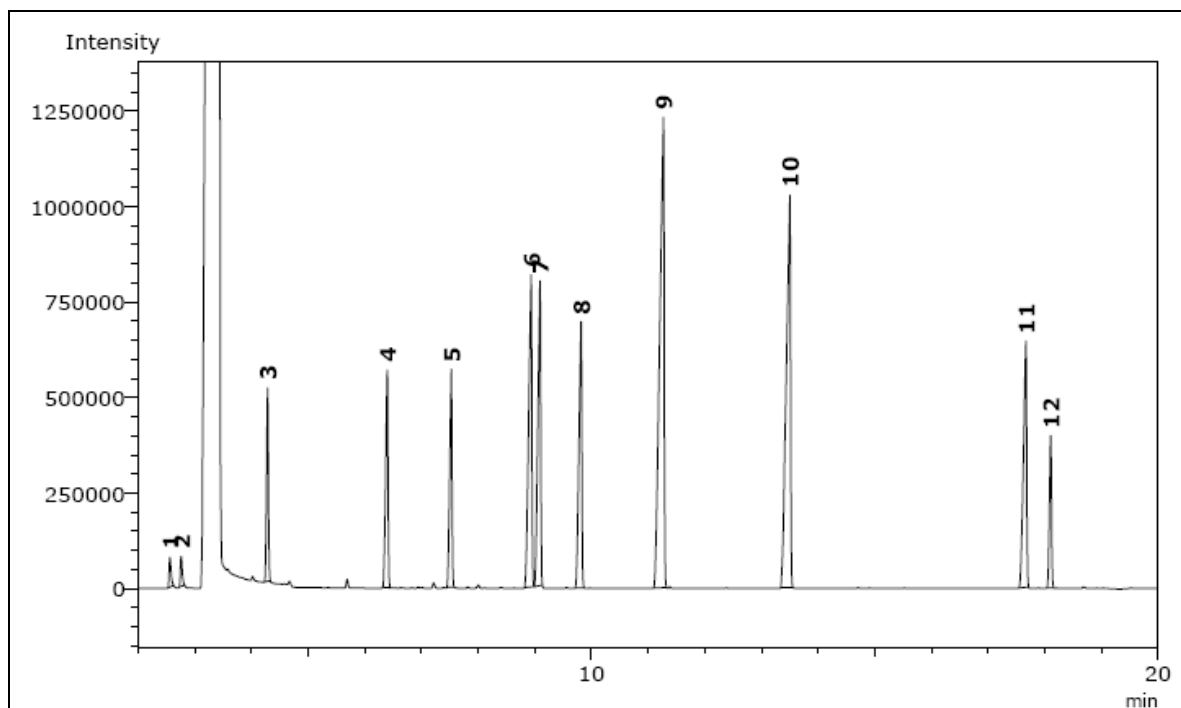


Figura 4: Cromatograma da mistura dos 12 ésteres: acetato de etila (1), propionato de metila (2), acetato de isobutila (3), butirato de propila (4), acetato de pentila (5), caproato de etila (6), propionato de pentila (7), acetato de hexila (8), heptanoato de etila (9), caprilato de etila (10), caprato de etila (11) e benzoato de etila (12).

Para a escolha da melhor fibra extratora foi utilizada a concentração de 100 mg L^{-1} da mistura de ésteres e as fibras de PDMS, PDMS-DVB, Car-PDMS e PA. A Figura 5 mostra a resposta de cada fibra analisada. A resposta é o somatório das áreas de cada um dos 12 picos.

A melhor resposta obtida foi para a fibra de PDMS, já que se obteve a maior área total. Este comportamento pode ser explicado pela polaridade das fibras. PDMS é uma fibra de caráter apolar e por isso tem maior interação com a mistura de ésteres e por tanto tem maior eficiência na extração destes analitos. As fibras PDMS-DVB e Car-PDMS têm caráter bipolar, por isso também tem uma boa interação com a mistura de ésteres, porém não melhor que a fibra de PDMS. A fibra de PA tem caráter polar, daí sua baixa eficiência em extrair a mistura.

Também devido ao caráter apolar da fibra de PDMS é que se pode explicar os tamanhos diferentes dos picos dos ésteres que compõe a mistura. Para ésteres com menor número de carbonos (menor massa molecular) a extração não é tão eficiente, como é o caso dos ésteres acetato de etila e propionato de metila que apresentam picos relativamente pequenos. Porém para ésteres com maior número

de carbonos (maior massa molecular) e, por tanto, mais apolares do que os ésteres menores, a extração mostrou-se mais eficiente, isso devido à maior interação entre analito e fibra, como é o caso dos ésteres heptanoato de etila e caprilato de etila que apresentam picos relativamente grandes.

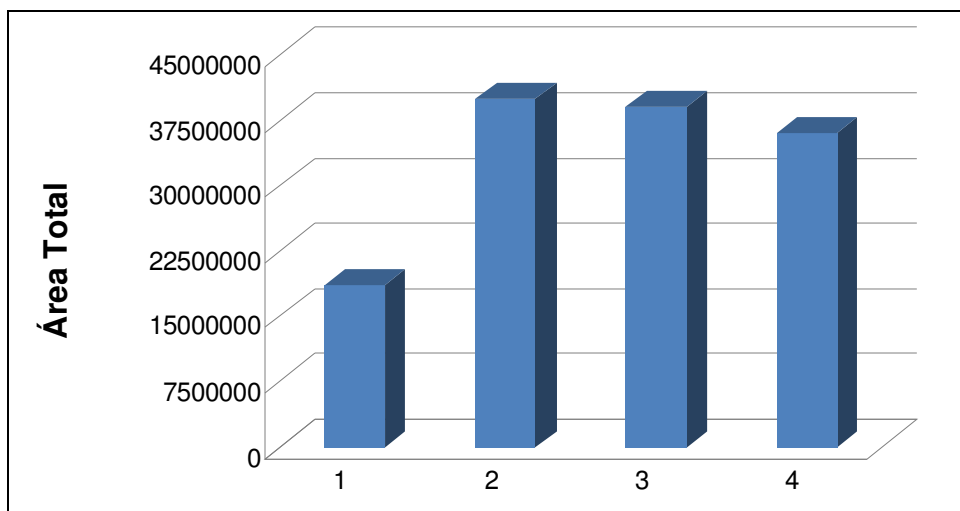


Figura 5: Gráfico de área total (somatório das áreas dos picos dos doze padrões de ésteres) versus tipo de fibra, PA (1), PDMS (2), CAR-PDMS (3) e PDMS-DVB (4).

Já com a fibra PDMS escolhida, foi estudado o efeito da diluição que é mostrado na Figura 6. Nota-se que quando a percentagem de etanol é de 20% a resposta obtida é maior (o somatório das áreas dos picos é maior) e conforme essa percentagem aumenta a resposta diminui. Este efeito pode ocorrer devido a uma competição entre solvente e analitos pela fibra, por tanto quanto maior a quantidade de solvente, maior será a sua extração em relação aos analitos, já que está em excesso. Outro efeito que pode estar influenciando na extração é o fato de que quando se aumenta a percentagem de solvente orgânico na solução aquosa, a solubilidade dos analitos também aumenta, então há uma preferência pelos analitos em ficar em solução a se volatilizarem, e como a extração é feita no *headspace* a eficiência fica comprometida.

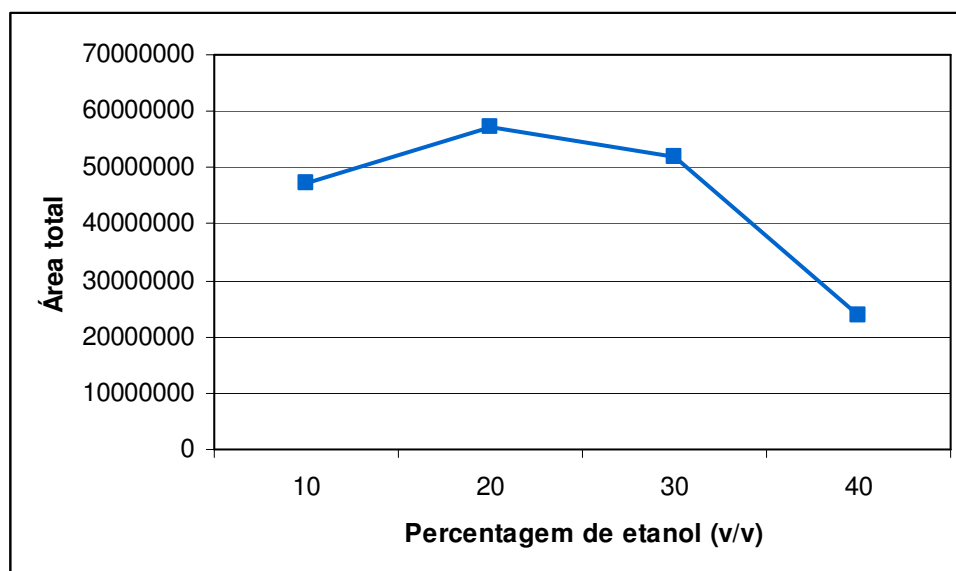


Figura 6: Efeito da diluição, gráfico de área total de ésteres versus percentagem de etanol v/v.

Apesar da solução de 20% de etanol se mostrar a mais adequada para a otimização multivariada dos parâmetros tempo e temperatura de extração e massa de sal, optou-se pela utilização da solução etanólica contendo 40% v/v, por mero capricho.

Na otimização os níveis estudados de cada variável estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 5: Níveis estudados das variáveis do planejamento fatorial completo.

| Experimento | Temperatura de extração | Massa de sal | Tempo de extração |
|-------------|-------------------------|--------------|-------------------|
| 1 | 10 °C | 0 g | 10 min |
| 2 | 10 °C | 0 g | 20 min |
| 3 | 10 °C | 1,25 g | 10 min |
| 4 | 10 °C | 1,25 g | 20 min |
| 5 | 40 °C | 0 g | 10 min |
| 6 | 40 °C | 0 g | 20 min |
| 7 | 40 °C | 1,25 g | 10 min |
| 8 | 40 °C | 1,25 g | 20 min |
| 9 | 25 °C | 0,62 g | 15 min |
| 10 | 25 °C | 0,62 g | 15 min |
| 11 | 25 °C | 0,62 g | 15 min |
| 12 | 25 °C | 0,62 g | 15 min |

Após se ter feito os 12 experimentos, os resultados obtidos foram expressos pelo gráfico de Pareto abaixo (Figura 7).

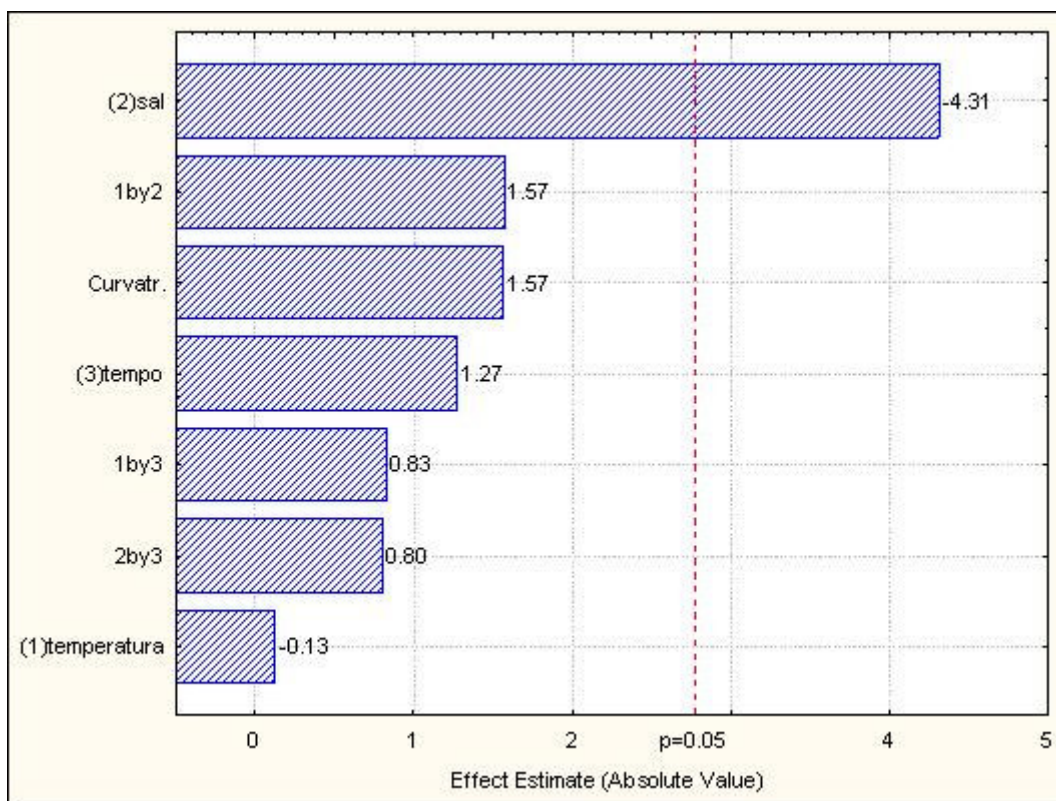


Figura 7: Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial completo. Os efeitos que ultrapassam a linha de $p = 0,05$ são estatisticamente significativos sobre a resposta analítica com 95% de confiança.

Com relação aos sinais algébricos dos efeitos, a seguinte interpretação deve ser feita: valores positivos de efeito estimado indicam um aumento na resposta quando a variável segue em direção ao seu nível máximo. Valores negativos indicam maiores respostas em direção ao nível inferior da variável. Para as interações, valores positivos indicam que a resposta aumentará se as duas variáveis forem em direção ao mesmo nível, inferior ou superior. E valores negativos indicam um aumento na resposta se as variáveis forem em direções contrárias, ou seja, uma variável em direção ao nível superior e a outra em direção ao nível inferior [29].

Observa-se que o único efeito estatisticamente significativo foi a massa de sal que apresenta sinal negativo, o que indica que quanto menor for a massa de sal utilizada durante a extração, maior será a massa extraída dos analitos da amostra. Este resultado é contrário ao esperado, pois, geralmente, o aumento da força iônica

da solução diminui a solubilidade de analitos orgânicos em solução aquosa e, conseqüentemente, aumenta a concentração dos analitos no *headspace* da amostra.

Uma justificativa para o comportamento da mistura de ésteres é o fato de que quando se aumenta a força iônica do meio, também se pode alterar a viscosidade da amostra que pode levar a uma diminuição da difusão dos analitos na amostra da solução para seu *headspace*, diminuindo a massa de analitos extraída.

Temperatura e tempo de extração não se mostraram significativos na extração da mistura de ésteres. Também não foram significativas as interações entre os três parâmetros (1by2, 1by3 e 2by3).

Para a construção das curvas de calibração, foram adotados os seguintes valores: 20 minutos de extração, pois, apesar do tempo não se mostrar significativo na extração da mistura de ésteres, havia-se tempo para prolongar o experimento, já que cada corrida cromatográfica levava cerca de 35 minutos; 25°C, por ser a temperatura mais próxima da ambiente e deste modo mais facilmente controlável; e sem adição de sal, conforme o gráfico de Pareto..

As figuras analíticas de mérito obtidas estão apresentadas na Tabela 6. Os limites de detecção foram avaliados como sendo 3 vezes a estimativa do desvio padrão do branco dividido pela inclinação da curva de calibração. A faixa de concentração estudada foi de 1,0 - 15,0 mg L⁻¹.

Tabela 6 - Figuras analíticas de mérito obtidas para a mistura de ésteres

| Analito | LD ^a (µg L ⁻¹) | R ^b | RSD ^c (%) |
|-----------------------|---------------------------------------|----------------|----------------------|
| acetato de etila | 75 | 0,99903 | 2,51 |
| acetato de hexila | 0,8 | 0,99876 | 1,22 |
| acetato de isobutila | 18 | 0,99737 | 6,02 |
| acetato de pentila | 17 | 0,99936 | 8,87 |
| benzoato de etila | 1,5 | 0,99994 | 1,80 |
| butirato de propila | 11 | 0,99942 | 5,67 |
| caprato de etila | 0,4 | 0,99767 | 1,18 |
| caprilato de etila | 2,0 | 0,99870 | 7,85 |
| caproato de etila | 1,7 | 0,99893 | 1,94 |
| heptanoato de etila | 1,8 | 0,99859 | 4,16 |
| propionato de metila | 55 | 0,99928 | 2,15 |
| propionato de pentila | 1,0 | 0,99893 | 1,58 |

^alimite de detecção; ^b coeficiente de correlação; ^c desvio padrão relativo.

Para verificar a exatidão da metodologia, um estudo de recuperação e de exatidão foi realizado. Recuperação é a medida da eficiência do procedimento de extração do analito e pode ser calculada pela Equação 5.

$$R(\%) = \frac{\text{valor obtido} \times 100}{\text{valor real}}$$

Equação 5

A exatidão determina a existência de erro sistemático em uma análise e pode ser calculada a partir da Equação 6:

$$E(\%) = \frac{\text{valor real} - \text{valor obtido} \times 100}{\text{valor real}}$$

Equação 6

Uma amostra de cachaça com 10 mg L⁻¹ da mistura de ésteres foi utilizada e a média de recuperação e média de exatidão, que foram feitas ambas em triplicata, são mostradas na Tabela 7.

Tabela 7 - Recuperações obtidas para a amostra de cachaça analisada

| Analito | Recuperação (%) | RSD (%) | Exatidão (%) |
|-----------------------|-----------------|---------|--------------|
| acetato de etila | 112,7 | 2,3 | 12,7 |
| acetato de hexila | 119,7 | 4,9 | 19,7 |
| acetato de isobutila | 104,0 | 2,7 | 4 |
| acetato de pentila | 93,4 | 4,6 | -6,6 |
| benzoato de etila | 93,2 | 4,6 | -6,8 |
| butirato de propila | 100,2 | 7,3 | 0,2 |
| caprato de etila | 81,1 | 8,8 | -18,9 |
| caprilato de etila | 72,1 | 7,2 | -27,9 |
| caproato de etila | 98,6 | 3,0 | -1,4 |
| heptanoato de etila | 92,7 | 4,3 | -7,3 |
| propionato de metila | 101,6 | 6,6 | 1,6 |
| propionato de pentila | 119,9 | 6,4 | 19,9 |

Para validação de métodos cromatográficos, as recuperações devem estar entre 85 e 115% [34]. Portanto, com exceção dos ésteres acetato de hexila, caprato

de etila, caprilato de etila e propionato de pentila, todos os valores obtidos estão dentro do intervalo. Os valores de RSD encontrados são bastante razoáveis, já que são aceitos valores até 15% [34]. O intervalo sugerido pela literatura para a exatidão é de $\pm 15\%$ [34], assim os ésteres acetato de hexila, caprato de etila, caprilato de etila e propionato de pentila não estão de acordo com esse intervalo.

Foram analisadas 5 marcas de cachaças e as concentrações encontradas de ésteres estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Concentrações dos ésteres encontradas em amostras de cachaças

| Analito | Pirassununga | Velho Barreiro | Pingo de Ouro | Salinas | Central de Minas |
|-----------------------|----------------------------------|----------------|---------------|---------|------------------|
| | Concentração, mg L ⁻¹ | | | | |
| acetato de etila | 20,78 | 14,54 | 18,60 | 97,80 | 90,99 |
| acetato de hexila | < LD* | < LD | ND** | ND | ND |
| acetato de isobutila | ND | 1,65 | < LD | < LD | < LD |
| acetato de pentila | ND | ND | ND | ND | ND |
| benzoato de etila | 1,07 | < LD | 1,19 | < LD | < LD |
| butirato de propila | 1,66 | 1,24 | 1,16 | 1,13 | 2,21 |
| caprato de etila | 1,77 | 3,19 | 1,54 | 1,26 | 1,16 |
| caprilato de etila | 2,91 | 3,42 | 1,89 | 1,15 | 1,16 |
| caproato de etila | 1,41 | 1,21 | 1,49 | 1,07 | 1,09 |
| heptanoato de etila | < LD | < LD | < LD | 1,01 | < LD |
| propionato de metila | ND | 2,01 | 2,04 | ND | ND |
| propionato de pentila | 15,15 | 24,33 | 23,71 | < LD | < LD |

*< LD: Concentrações abaixo do limite de detecção.

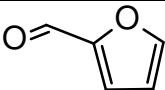
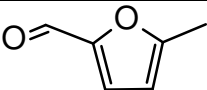

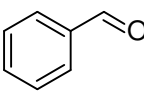
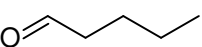
**ND: Não Detectável

O único éster controlado pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento, é o acetato de etila e o limite é de 200 mg / 100 mL de álcool anidro, cerca de 800 mg / L de cachaça. Assim, após conversão de unidades dos resultados da tabela acima, não foi encontrado valor acima do limite.

4.1.2 Aldeídos

Uma mistura de 5 aldeídos foi estudada: furfural, benzaldeído, acetaldeído, valeraldeído e 5-metil-furfural. A Tabela 9 apresenta as estruturas destes aldeídos.

Tabela 9: Estruturas dos aldeídos que compõem a mistura estudada.

| | | |
|--|--|--|
|  Furfural | |  5-metil-furfural |
|  Acetaldeído |  Benzaldeído |  Valeraldeído |

Da mesma maneira que para a mistura de ésteres, para a escolha da melhor fibra extratora foi utilizada a concentração de 100 mg L^{-1} da mistura de aldeídos e as fibras PDMS, PDMS-DVB, Car-PDMS e PA. A Figura 8 mostra a resposta de cada fibra analisada.

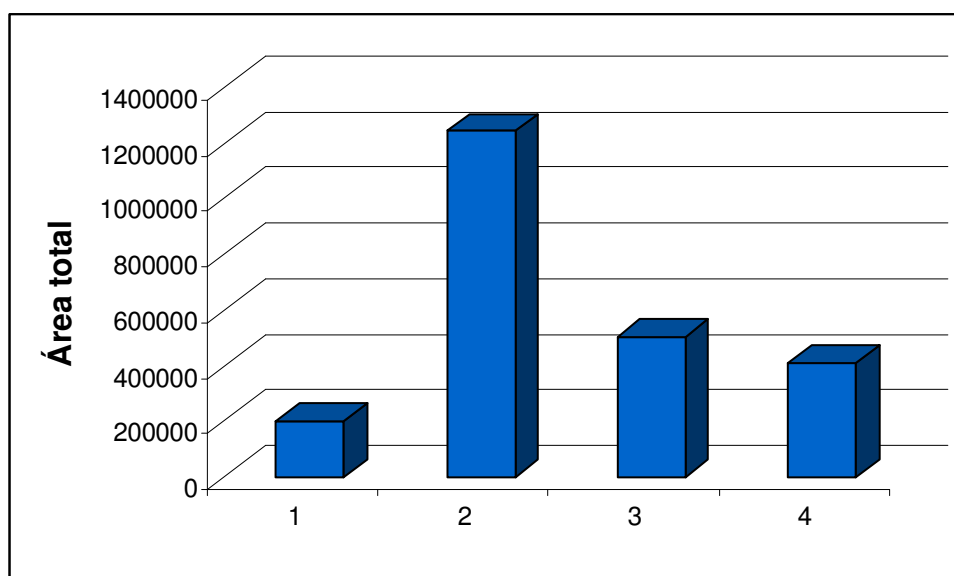


Figura 8: Área total de aldeídos para cada fibra analisada. PDMS (1), PDMS-DVB (2), CAR-PDMS (3) e PA (4).

A melhor resposta obtida foi para a fibra PDMS-DVB, já que se obteve a maior área total. Este comportamento pode ser explicado pela polaridade das fibras e da mistura de aldeídos estudada. A mistura contém aldeídos com polaridades distintas, alguns como o acetaldeído são relativamente polares, enquanto outros, como é o caso de benzaldeído, são relativamente apolares, então fibras como PDMS-DVB e Car-PDMS, que têm caráter bipolar, tem uma melhor interação com a

mistura de aldeídos. PDMS é uma fibra de caráter apolar e por isso tem baixa interação com esta mistura e a fibra de PA tem caráter polar e também tem baixa eficiência em extrair a mistura.

Com a fibra já escolhida, foi estudado o efeito da diluição que é mostrado na Figura 9. Nota-se que quando a percentagem de etanol é de 10% a resposta obtida é maior e conforme essa percentagem é aumentada a resposta diminui, como esperado.

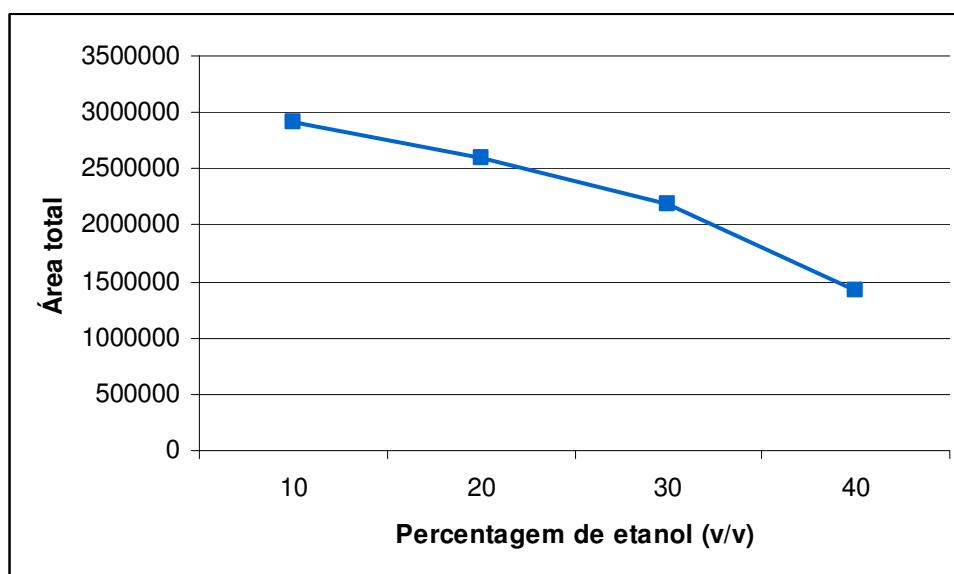


Figura 9: Efeito da diluição, gráfico de área total de aldeídos versus percentagem de etanol v/v.

De posse das melhores fibra (PDMS-DVB) e percentagem de etanol (10%), seguiu-se com a otimização multivariada, e o resultado dos 12 experimentos são mostrados na Figura 10.

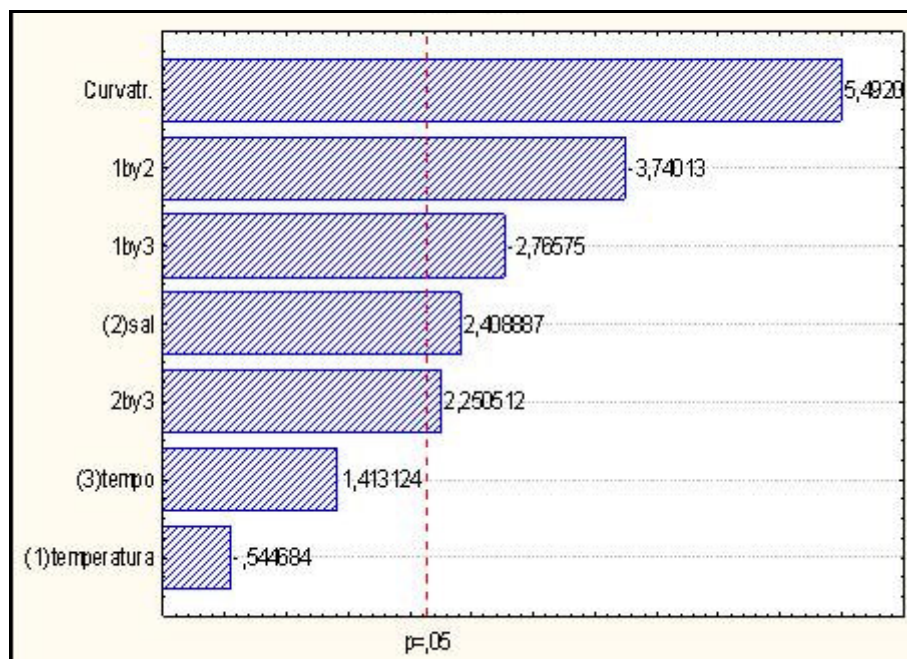


Figura 10: Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial completo para os aldeídos.

O gráfico de Pareto para a mistura de aldeídos mostra que um efeito estatisticamente significativo é a massa de sal. O sinal positivo que apresenta este efeito sugere que quanto maior for a massa de sal utilizada durante a extração, maior será a massa extraída dos analitos da amostra.

Os outros dois efeitos estudados, tempo e temperatura, não foram significativos. Porém pode-se observar que a interação entre temperatura e massa de sal (1by2) é significativa e seu valor negativo indica um aumento na resposta se as variáveis forem em direções contrárias, ou seja, ao se utilizar massa maior de sal, a temperatura de trabalho deve ser a menor, assim se obtém maior massa extraída dos analitos. Também se observa que a interação entre temperatura e tempo (1by3) é significativa e a exemplo da interação entre temperatura e massa de sal seu sinal é negativo e a resposta é aumentada quando as variáveis forem em direções opostas. A interação entre tempo e massa de sal (2by3) é significativa e seu sinal é positivo sugerindo que as duas variáveis devem seguir no mesmo sentido para se obter melhores resultados. Ao se utilizar massa maior de sal, o tempo de extração deve ser o maior possível.

Sendo assim, as condições ótimas de extração dos aldeídos da amostra utilizadas são: 10°C, na presença de 1,25 g de sal. E o tempo de extração selecionado foi de 20 minutos, por conveniência.

A quantificação dos aldeídos em cachaça não foi realizada pelo fato de que apareceram mais picos do que deveria, ao se injetar a mistura de padrões dos aldeídos no cromatógrafo.

A princípio pensou-se que os padrões poderiam estar contaminados, mas após análise cromatográfica individual de cada padrão puro, por injeção direta, pode-se verificar que não se tratava de impurezas. E quando cada padrão foi analisado individualmente por HS-SPME, em uma solução alcoólica 40% v/v, observou-se que além do pico do composto apareciam mais alguns picos.

Isto sugere que podem estar ocorrendo reações entre os aldeídos e o solvente ou entre os próprios aldeídos. Por meio da análise da mistura de padrões no GC-MS foi possível identificar os demais picos, confirmando então a hipótese de que estariam ocorrendo reações na mistura de padrões (Figura 11).

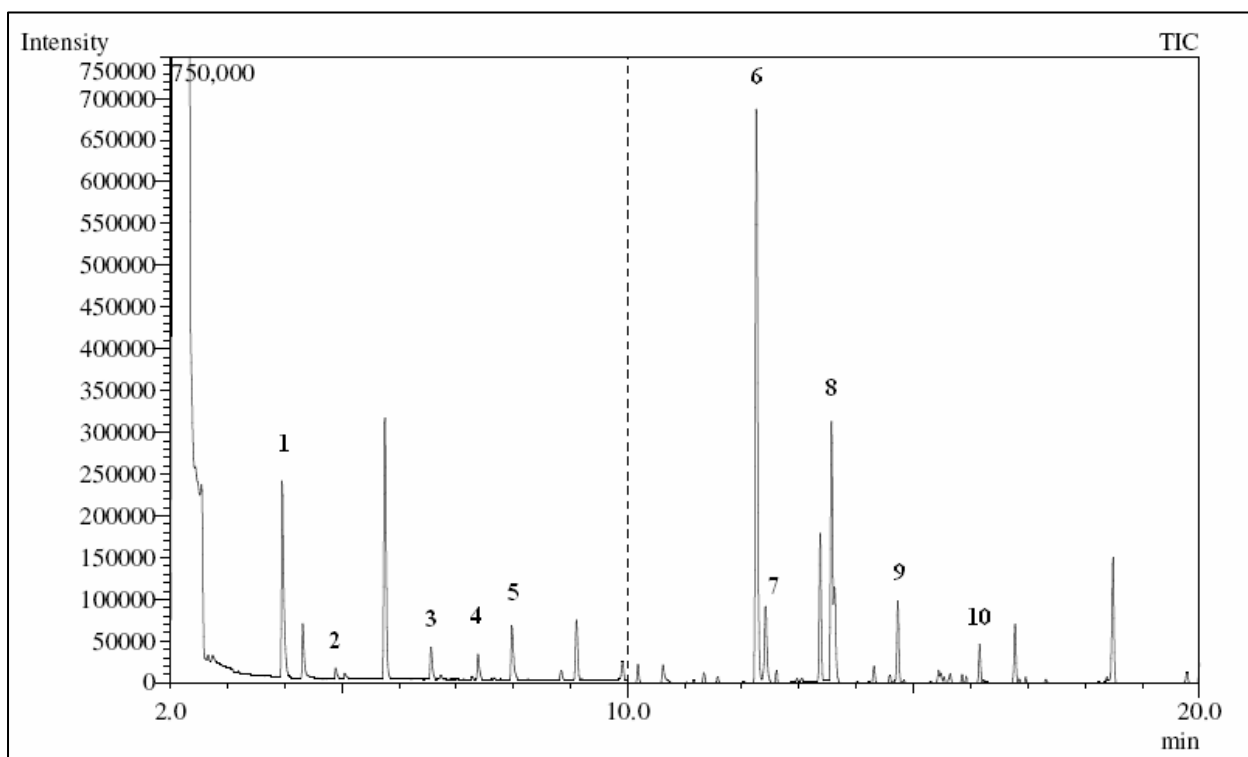


Figura 11: Cromatograma de íons totais da mistura de aldeídos e alguns dos seus derivados: valeraldeído (1), paraldeído (2), propanaldietilacetal (3), furfural (4), benzaldeído (5), 5-metil-furfural (6), dietil acetal valeraldeído (7), parapropionaldeído (8) e dietil acetal 2-furfural (9).

Uma das reações que podem estar acontecendo é a formação de acetal, pela reação de aldeído com o etanol (Figura 12). Esta reação é evidenciada pela transformação do furfural (pico 4) em dietil acetal 2-furfural (pico 9), como mostrado no cromatograma acima.

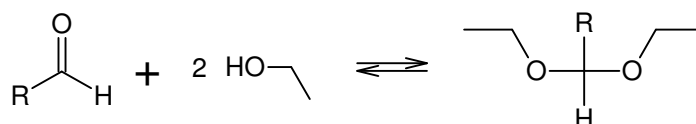


Figura 12 - Formação de acetal pela reação de aldeído com etanol [35].

Outra reação que possivelmente acontece é interação entre aldeídos (Figura 13), evidenciado pela aparição do paraldeído (pico 2) no cromatograma da mistura de padrões (Figura 11) proveniente do acetaldeído, um dos aldeídos da mistura, que não aparece no cromatograma, pois seu tempo de retenção é menor do que o do solvente.

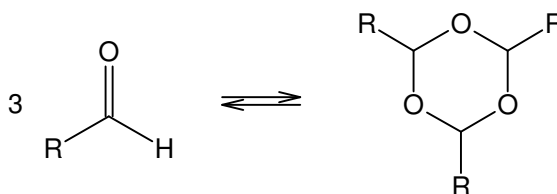


Figura 13 - Reação entre aldeídos [35].

Estes mesmos derivados de aldeídos encontrados na mistura de padrões foram encontrados nas amostras de cachaça. Assim, como os aldeídos tanto na mistura de padrões quanto nas amostras de cachaça estão sujeitos a reações, não foi possível quantificá-los.

4.1.3 Álcoois

Uma mistura de 5 álcoois foi estudada: metanol, iso-butanol, butanol, 2-metil-butanol e eugenol. A Tabela 10 traz representações das estruturas dos compostos estudados e a Figura 14 mostra o cromatograma dos padrões de álcoois.

Tabela 10: Estruturas dos álcoois que compõem a mistura estudada.

| | | |
|--|-------------------------------|--|
| <chem>CC(C)CO</chem> iso-butanol | | <chem>COc1ccc(C=C)cc1O</chem> eugenol |
| <chem>CCC(C)CO</chem> 2-metil-butanol | <chem>CCCCO</chem> butanol | <chem>CO</chem> metanol |

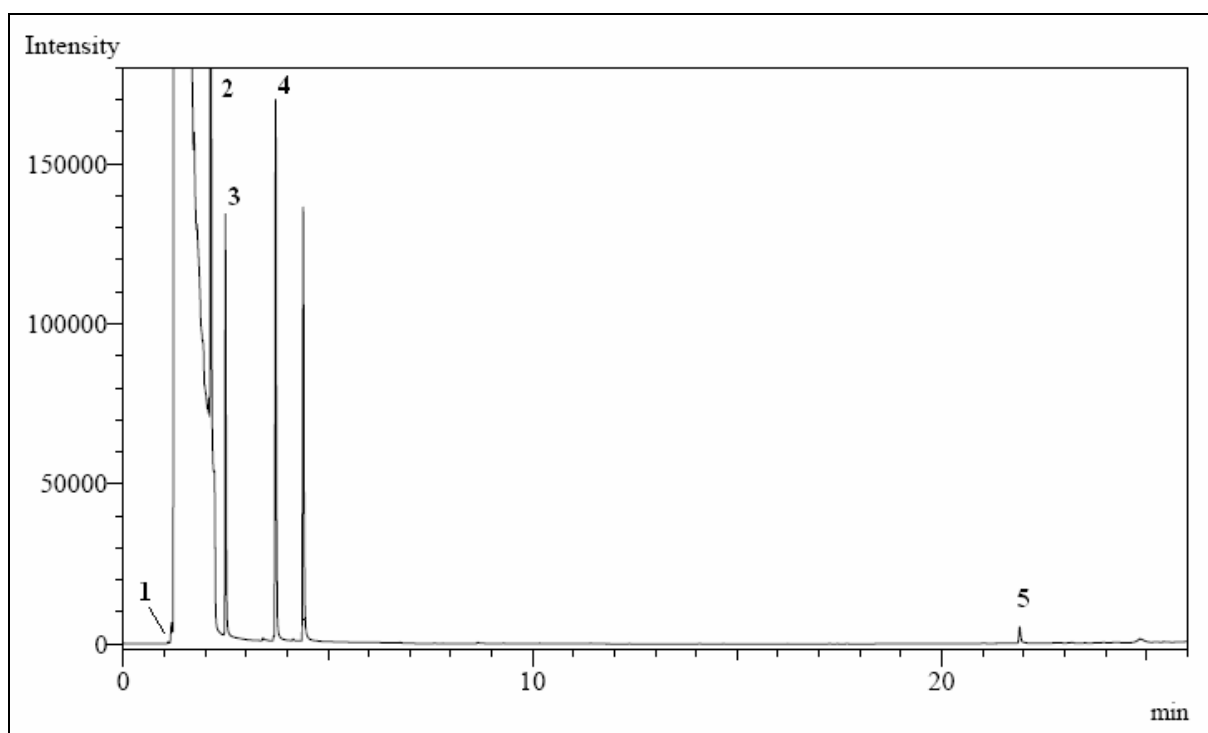


Figura 14 - Cromatograma dos padrões de álcoois: metanol (1), iso-butanol (2), butanol (3), 2-metil-butanol (4) e eugenol (5).

Da mesma maneira que para a mistura de ésteres e de aldeídos, para a escolha da melhor fibra extratora foi utilizada a concentração de 100 mg L⁻¹ da mistura de álcoois e as fibras PDMS, PDMS-DVB, Car-PDMS e PA. A Figura 15 mostra a resposta das fibras PDMS e PA. As outras fibras analisadas foram descartadas, pois não extraíram da amostra todos os analitos.

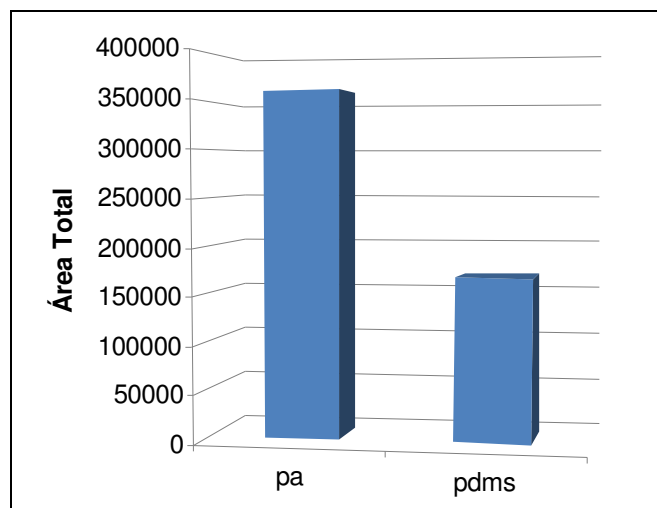


Figura 15 - Área total de álcoois para as fibras analisadas: PDMS e PA.

Nota-se claramente que a melhor resposta obtida foi para a fibra PA. Esta fibra é polar, ao contrário da PDMS, o que explica sua melhor eficiência na extração. Também pode ser explicado pela polaridade da fibra PA o porquê da área do pico do eugenol ser tão menor relativamente as áreas dos outros picos. Como a fibra é polar e o eugenol ter um caráter apolar sua interação não é muito boa, então a extração deste álcool do *headspace* não é eficiente.

O estudo do efeito da diluição que é mostrado na Figura 16. Nota-se que quando a percentagem de etanol é de 30% a resposta obtida é a maior.

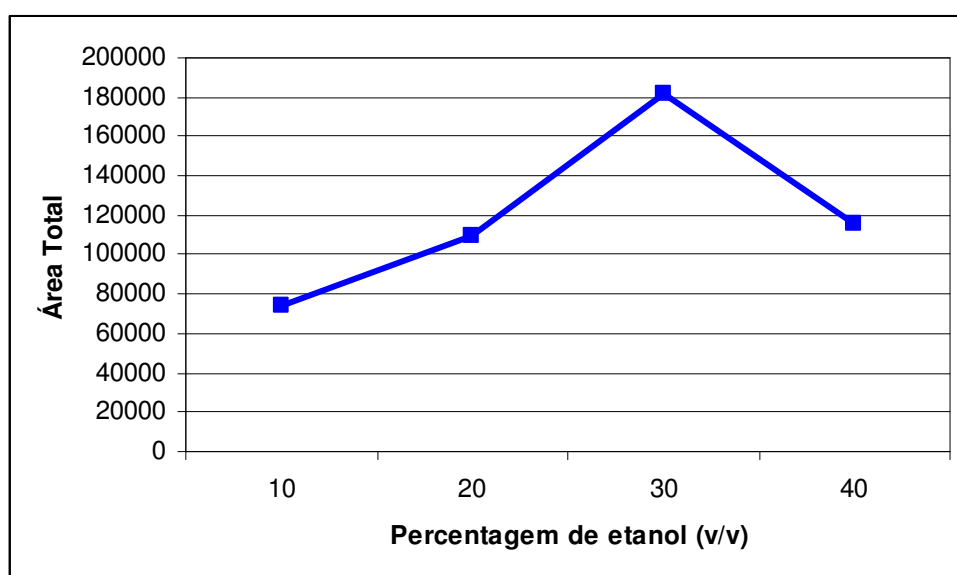


Figura 16 - Efeito da diluição, gráfico de área total de álcoois versus percentagem de etanol v/v.

De posse da melhor fibra (PA) e melhor percentagem de etanol (30%), fez-se a otimização multivariada, e o resultado dos 12 experimentos são mostrados na Figura 17.

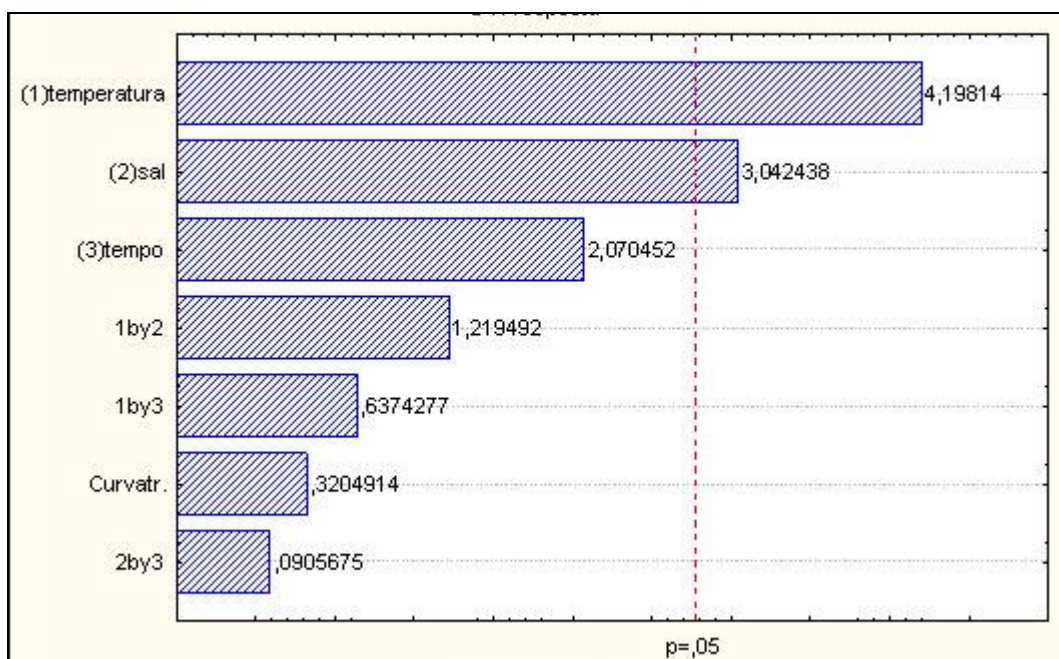


Figura 17 - Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial completo para a mistura de álcoois.

O gráfico de Pareto para a mistura de álcoois mostra que para a temperatura e massa de sal há um efeito estatisticamente significativo. O sinal positivo que apresentam estes efeitos sugere que quanto maior for a temperatura e a massa de sal utilizadas durante a extração, maior será a massa extraída dos analitos da amostra. Já o tempo não foi estatisticamente significativo, assim como as interações entre as três variáveis do planejamento (1by2, 1by3 e 2by3), porém, por conveniência optou-se pelo maior tempo de extração.

Sendo assim, as condições ótimas de extração dos álcoois da amostra utilizadas foram: 20 minutos de extração a 40°C e com 1,25 g de sal.

A Tabela 11 apresenta as figuras analíticas de mérito obtidas para a mistura de álcoois. Os limites de detecção foram avaliados como sendo 3 vezes a estimativa do desvio do branco dividido por 10 vezes a inclinação da curva de calibração. A faixa de concentração estudada foi de 2,0 - 50,0 mg L⁻¹.

Tabela 11 - Figuras analíticas de mérito obtidas para a mistura de álcoois

| Analito | LD^a (µg L⁻¹) | R^b | RSD^c (%) |
|-----------------|---|----------------------|----------------------------|
| Metanol | 18,5 | 0,99989 | 2,15 |
| Iso-butanol | 0,24 | 0,99997 | 2,96 |
| Butanol | 0,11 | 0,99963 | 5,96 |
| 2-metil-butanol | 0,36 | 0,99968 | 2,98 |
| eugenol | 31,8 | 0,99978 | 6,63 |

^alimite de detecção; ^b coeficiente de correlação; ^c desvio padrão relativo.

Assim como foi feito para verificar a exatidão da metodologia para os ésteres, um estudo de recuperação e exatidão foi realizado para a mistura dos álcoois. Uma amostra de cachaça com 10 mg L⁻¹ da mistura de álcoois foi utilizada e a média de recuperação e a média de exatidão, que foram feitas em triplicata, são mostradas na Tabela 12.

Tabela 12 - Recuperação da mistura de álcoois obtida para amostra de cachaça analisada

| Analito | Recuperação (%) | RSD (%) | Exatidão (%) |
|-----------------|------------------------|----------------|---------------------|
| Metanol | 98,0 | 6,1 | -2 |
| Iso-butanol | 101,6 | 2,4 | 1,6 |
| Butanol | 94,1 | 4,8 | -5,9 |
| 2-metil-butanol | 91,4 | 2,1 | -8,6 |
| eugenol | 86,7 | 10,7 | -13,3 |

Todos os valores obtidos na recuperação estão dentro do intervalo sugerido de 85-115% e os valores de RSD encontrados são bastante razoáveis (valores aceitos até 15%). Os valores de exatidão obtidos estão todos dentro do intervalo sugerido pela literatura ($\pm 15\%$).

Foram analisadas 15 marcas de cachaças e as concentrações encontradas de álcoois estão apresentadas na Tabela 13.

Para que seja possível a quantificação do butanol, seria necessária a construção de uma segunda curva de calibração, com faixa de estudo em µg L⁻¹.

A concentração limite permitida pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento para o metanol é de 20 mg/100 mL de álcool anidro. Embora a metodologia aplicada neste trabalho difira com a utilizada pelo órgão do governo

(método colorimétrico), depois de apropriada conversão dos valores encontrados nas amostras, observou-se que, com exceção de Armazém Vieira, Pirassununga e A Praiana, todas apresentaram valores acima do permitido para metanol. As cachaças Pingo de Ouro, Velho Barreiro e Tatuzinho foram as que mais apresentaram o álcool metílico, cerca de 50 mg/100 mL de álcool anidro.

Tabela 13 - Concentrações de álcoois encontradas nas amostras de cachaças

| Analito | metanol | iso-butanol | butanol | 2-metil-butanol | eugenol |
|----------------|----------------------------------|-------------|---------|-----------------|---------|
| | Concentração, mg L ⁻¹ | | | | |
| Box 32 | 145,04 | 32,63 | < LD* | 146,34 | < LD |
| Armazém Vieira | 76,37 | 4,94 | < LD | 38,40 | < LD |
| Boazinha | 150,81 | 20,44 | < LD | 79,29 | < LD |
| Seleta | 91,08 | 13,55 | < LD | 69,29 | < LD |
| Ypióca | 147,71 | 21,26 | < LD | 95,20 | < LD |
| Sagatiba | 42,41 | 41,51 | < LD | 154,18 | 31,31 |
| Pingo de Ouro | 206,66 | 55,76 | < LD | 273,13 | 35,07 |
| Pirassununga | 18,62 | < LD | < LD | 3,84 | < LD |
| Velho Barreiro | 216,56 | 22,74 | < LD | 129,64 | < LD |
| A Praiana 2 | 111,08 | 8,44 | < LD | 52,95 | < LD |
| A Praiana | 47,58 | 14,50 | < LD | 72,71 | 27,22 |
| Pitú | 147,16 | 39,40 | < LD | 130,01 | < LD |
| Nº 1 Spézia | 112,14 | 19,55 | < LD | 106,43 | < LD |
| 3 Fazendas | 138,94 | 14,99 | < LD | 82,02 | < LD |
| Tatuzinho | 199,58 | 26,06 | < LD | 153,84 | < LD |

*< LD: Concentrações abaixo do limite de detecção.

O Ministério da Agricultura e Abastecimento também faz controle dos álcoois superiores, pela soma dos álcoois 2-metil-propanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol e 1-propanol. Porém, pela falta de padrões de alguns destes álcoois, não foi possível fazer uma comparação com o limite permitido pelo governo que é de 360 mg/100 mL de álcool anidro.

4.2 Qualificação dos componentes das cachaças e análise sensorial

Poucos trabalhos foram realizados até o momento com o objetivo de identificar, através de GC ou GC-MS, compostos voláteis com potencial impacto no aroma da cachaça.

Através da técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, foi possível identificar a grande maioria dos analitos que compõem as 17 amostras de cachaças analisadas: Box 32, Armazém Vieira, Boazinha, Seleta, Ypióca, Sagatiba, Pingo de Ouro, Pirassununga, Velho Barreiro, A Praiana 2, A Praiana, Pitu, Nº 1 Spézia, 3 Fazendas, Tatuzinho, Salinas e Central de Minas. Os cromatogramas de todas as amostras encontram-se em anexo.

Os compostos que foram encontrados com maior frequência e maiores concentrações estão listados na Tabela 14. Como a aquisição dos dados só foi feita a partir de 2 min de análise, alguns compostos como o metanol, por exemplo, que tem tempos de retenção menores não aparecem na lista, assim como compostos com concentrações relativamente baixas. A probabilidade usada na identificação dos compostos foi de no mínimo 95%.

Além da identificação dos analitos que compõem as cachaças, realizou-se a análise sensorial (Tabela 15) das amostras com o objetivo de se identificar os compostos que atribuem as cachaças uma melhor aceitabilidade ou uma pior aceitabilidade. Porém não foi possível fazer uma relação entre a aceitabilidade e a composição, já que cada cachaça tem uma composição particular e cada um dos compostos voláteis tem importância na composição do aroma.

Muitos trabalhos desenvolvidos na área de bebidas utilizam SPME com GC-FID ou GC-MS. Nonato *et al* [5] extraiu compostos voláteis do *headspace* da cachaça por SPME com fibra PA, analisou por CG-MS e foi capaz de detectar um grande número de compostos. Destes 38 foram identificados, dos quais 11 eram ésteres. Castro [36] analisou os compostos do *headspace* de vinho, por SPME-GC-FID. Fez uso de fibra de CAR/PDMS e determinou 32 compostos, destes 13 eram ésteres. Riu-Aumatell [37] detectou mais de 90 compostos em sucos de frutas por GC-MS, utilizando a fibra de PDMS com extração no *headspace*. Demyttenaere [38] fez um estudo com várias fibras para SPME e concluiu que a melhor para a extração dos 21 compostos voláteis analisados por ele em whisky foi a de PA. O número de publicações vem aumentando, pois existe um grande interesse na qualificação e

também na quantificação destes compostos para que seja possível uma padronização e assim evitar adulterações.

Tabela 14: Compostos encontrados nas amostras de cachaças por GC-MS.

| | |
|---|---------------------------------------|
| 1,1,5,6-Tetrametil-indano | alfa.-Farneseno |
| 1,1,6-Trimetil-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno | beta.-Bisaboleno |
| 1,1,6-Trimetil-1,2,3,4-tetraidronaftaleno | beta.-Farneseno |
| 1,1-Dietoxi-2-metilpropano | Beta.-Mirceno |
| 1,1-Dietoxi-pentano | Biciclo[7.2.0]undec-4-eno |
| 1-Isopropil-7-metil-4-metileno-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidronaftaleno | Butanoato de etila |
| 1-Metil-4-isopropil-1,4-ciclo-hexadieno | Canfeno |
| 1-Pentadecanol | Caprato de etila |
| 2,2,6-Trimetil-decano | Caprilato de etila |
| 2,2-Dimetil-3-etilpentano | Caprilato isoamílico |
| 2,2-Dimetil-tetradecano | Caproato de Etila |
| 2,3-diciclo-hexil-butano | Ciclo-hexano |
| 2-Careno | Cinamaldeído |
| 2-Metil-1-butanol | Curcumeno |
| 2-Metil-1-propanol | Decanoato de isopentila |
| 3,6-Dimetil-undecano | delta.-Cadineno |
| 3,7-Dimetil-nonano | dietil acetal 2-furfural |
| 3-Careno | Dimetilsilanodiol |
| 3-Etil-3,5,5-trimetil-ciclo-hexanono | D-Limoneno |
| 3-Isopropenil-1-isopropil-4-metil-4-vinil-1-ciclohexeno | Ester dietílico do ácido butanodióico |
| (4-Metilpentil)ciclohexano | Éster p-propenilfenil metílico |
| 3-Metil-5-propilnonano | Furfural |
| 4-Metil-dodecano | gama.-Muuroleno |
| 4-Octadecilmorfolina | Hexanoato de etila |
| 5-Buti-Inonano | Lactato de etila |
| 5-Etil-2,2,3-trimetilheptano | L-beta-pineno |
| 9-decenoato de etila | N,N-Dimetil-1-nonadecanamina |
| (9E,12E)-9,12-octadecadienoato de etila | n-dodecanoato de etila |
| Acetato de etila | o-Isopropiltolueno |
| Acetato de isoamila | Paraldeído |
| Ácido pentadecanóico | Propanoato de etila |
| Álcool fenetil | R-alfa-Pineno |
| Álcool Iso-pentílico | Tetradecanoato de etila |
| alfa.-Amorfeno | trans-Cinamaldeído |
| alfa.-Cedreno | Tridecano |

O componente volátil majoritário nas cachaças é o etanol, porém ele é um dos componentes voláteis de menor destaque na definição do aroma por ter um aroma pouco marcante. No entanto compostos como aldeídos, alcoóis superiores (propílico, butílico e amílico) e ésteres, que possuem características de aroma mais marcantes, possuem grande impacto no aroma da bebida [6].

Odores específicos dos ésteres identificados neste trabalho, como o caprato de etila, o hexanoato de etila e o acetato de isoamila foram descritos na literatura [6] respectivamente como “uva”, “casca de maçã” e “banana”, já o éster caproato de etila foi descrito como “folha de planta” e estes também foram ésteres encontrados em concentrações relativamente altas por Nóbrega [6] e por Nonato *et al* [5].

Tabela 15: Resultados da análise sensorial das cachaças.

| Bebida | Média de Nota | Aceitabilidade (%) |
|----------------|---------------|--------------------|
| Tatuzinho | 5,32 | 59,11 |
| 3 Fazendas | 5,49 | 61,00 |
| Pingo de Ouro | 6,01 | 66,78 |
| A Praiana | 6,49 | 72,11 |
| A Praiana | 6,53 | 72,56 |
| Nº1 Spézia | 6,86 | 76,22 |
| Pirassununga | 6,94 | 77,11 |
| Velho Barreiro | 7,05 | 78,33 |
| Sagatiba | 7,33 | 81,44 |
| Ypióca | 7,50 | 83,33 |
| Boazinha | 7,54 | 83,78 |
| Seleta | 7,56 | 84,00 |
| Box 32 | 7,87 | 87,44 |
| Pitu | 8,01 | 89,00 |
| Armazém Vieira | 8,57 | 95,22 |

Além dos ésteres, outros compostos também se apresentam de forma marcante no aroma da cachaça. Um composto que também foi identificado em outros trabalhos [5, 6, 14] é o 3-metil-butanol que tem aroma descrito como “doce” [39].

Aldeídos também compõem o aroma da cachaça, porém é uma contribuição negativa, já que este grupo de compostos tem odor desagradável na maioria dos casos. Mas como aldeídos reagem facilmente com alcoóis formando acetais, o odor pungente é reduzido.

Em suma, vários compostos voláteis tem importância no aroma da cachaça, porém deve-se levar em consideração que as características de odor dependem das concentrações em que se encontram estes compostos, pois de forma muito elevada podem deixar de ser considerados agradáveis e se tornarem desagradáveis.

5. CONCLUSÕES

A metodologia analítica proposta neste trabalho, a microextração em fase sólida a partir do *headspace*, mostrou-se sensível e eficaz na determinação de compostos voláteis em cachaça.

Ao se comparar a eficiência de quatro diferentes tipos de fibras para SPME, observou-se que para cada grupo funcional dos analitos, uma fibra diferente mostrou-se mais adequada: para ésteres, a de PDMS; para aldeídos, a de PDMS-DVB e para álcoois, a de PA.

Quanto ao efeito do solvente, também cada grupo funcional teve uma resposta particular. A extração dos ésteres foi mais eficiente quando a percentagem de etanol na amostra era de 20%, já a extração de aldeídos quando a percentagem era de 10% e a extração de álcoois quando era de 30%.

A otimização multivariada dos parâmetros que afetam a eficiência de extração mostrou ser mais eficiente, rápida e barata do que a otimização univariada, pois foi possível obter um máximo de informações com um número reduzido de experimentos e ainda foi possível analisar as interações entre as variáveis.

A validação da metodologia foi feita através da obtenção dos parâmetros analíticos de mérito, os quais se mostraram bastante adequados. Para os ésteres, obtiveram-se limites de detecção na faixa de 0,4-75 $\mu\text{g L}^{-1}$, com recuperação média de 99,1% e exatidão média de -0,9%. Para os álcoois se obteve limites de detecção na faixa de 0,11-31,8 $\mu\text{g L}^{-1}$, recuperação média de 94,4% e exatidão média de -5,6%. Já os aldeídos não puderam ser quantificados devido a possíveis reações que podem estar ocorrendo no meio, como formação de acetais a partir dos próprios aldeídos.

Foram analisadas algumas amostras de diferentes marcas de cachaças e a faixa de concentração encontrada para ésteres foi de 0 a 97,80 mg L^{-1} e para álcoois foi de 3,84 a 273,13 mg L^{-1} . O único éster controlado pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento é o acetato de etila cujo limite é de 200 $\text{mg}/100\text{mL}$ de álcool anidro. Não foi encontrado valor acima desse limite. A concentração limite para o metanol é de 20 $\text{mg}/100\text{ mL}$ de álcool anidro. Nesse caso se observou que apenas três marcas estavam de acordo com o limite permitido e que outras três apresentaram mais que o dobro deste valor.

Por meio da técnica de GC-MS foi possível identificar a grande maioria dos analitos que compõem as amostras das cachaças analisadas. Cerca de 70 compostos foram encontrados com maior frequência e maiores concentrações, destes 15 são ésteres, que são os maiores responsáveis pelo aroma.

Por fim realizou-se uma análise sensorial que revelou, dentre as marcas analisadas, uma menor aceitabilidade para a marca Tatuzinho e a maior aceitabilidade para a Armazém Vieira.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

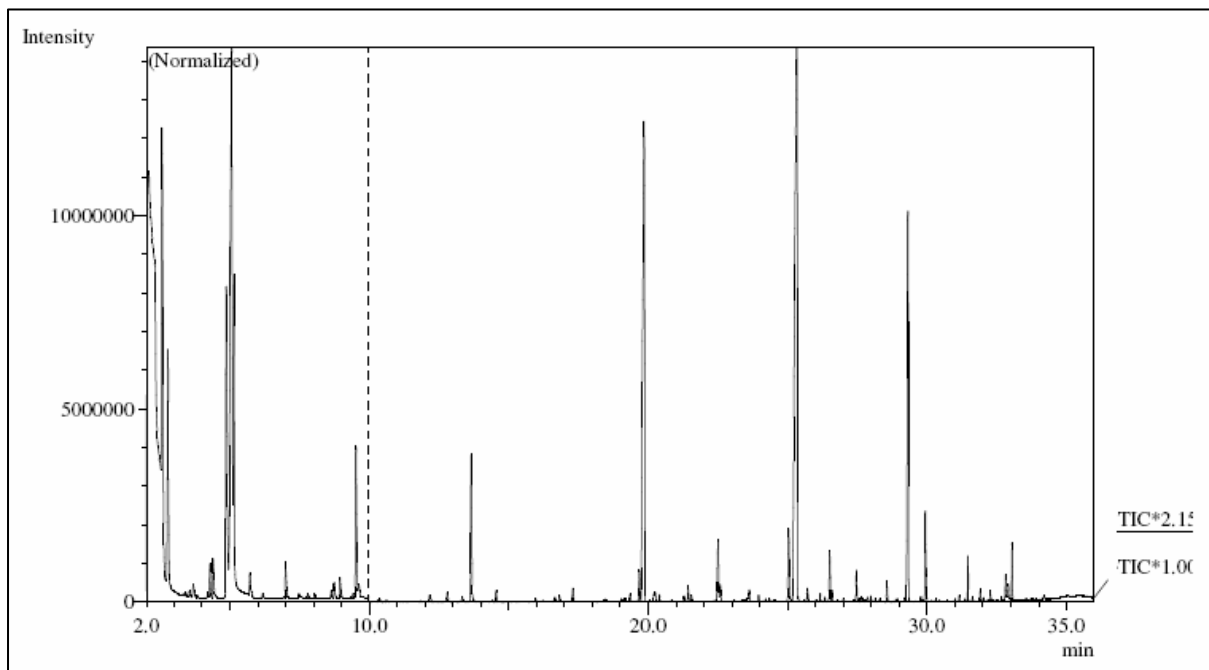
- [1] E. Aquaroni, U. A. Lima, W. Borzani, Alimentos e Bebidas Produzidos por Fermentação, Edgar Blucher, São Paulo, 1986.
- [2] M. E. O. Mamede, G. M. Pstore, Cien. Tecnol. Aliment. 24 (2004) 453.
- [3] L. Ng, Anal. Chim. Acta 465 (2002) 309.
- [4] Brasil, Ministério da Agricultura e Abastecimento, Diário Oficial da União (2005) 3-4.
- [5] E. A. Nonato, F. Carazza, F. C. Silva, C. R. Carvalho, Z. d. L. Cardeal, Journal of Agricultural and Food Chemistry 49 (2001) 3533-3539.
- [6] I. C. C. Nóbrega, Cien. Tecnol. Aliment. 23 (2003) 210-216.
- [7] ABRABE, Associação Brasileira de Bebidas. Disponível em <http://www.abrabe.org.br>. Acessado em: 29 de outubro de 2008.
- [8] N. E. Pereira, M. d. G. Cardoso, S. M. d. Azevedo, A. R. d. Moraes, W. Fernandes, P. M. Aguiar, Ciênc. Agrotec. 27 (2003) 1068-1075.
- [9] R. F. Nascimento, D. R. Cardoso, B. S. Lima Neto, D. W. Franco, Química Nova 21 (1998) 735-739.
- [10] F. Yokoya, Fabricação de aguardente de cana, Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", Campinas, 1995.
- [11] J. R. Pigott, Distilled beverage flavour, VCA, Weinheim, 1989.
- [12] H. M. A. B. Cardello, J. B. Faria, Ciência e Tecnologia de Alimentos 18 (1998).
- [13] B. Plutowska, W. Wardencki, Food Chemistry 101 (2007) 845-872.
- [14] G. Fitzgerald, K. J. James, K. MacNamara, M. A. Stack, Journal of Chromatography A 896 (2000) 351-359.
- [15] M. Adan, M. Juklová, T. Bajer, A. Eisner, K. Ventura, J. Chromatogr. A. 1084 (2005) 2-6.
- [16] M. F. Alpendurada, J. Chromatogr. A. 889 (2000) 3-14.
- [17] Z. Zhang, M. J. Yang, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 66 (1994) 844-853.
- [18] C. L. Arthur, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 62 (1990) 2145-2148.
- [19] Z. Zhang, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 65 (1993) 1843-1852.
- [20] H. Kataoka, H. L. Lord, J. Pawliszyn, J. Chromatogr. A. 880 (2000) 35-62.

- [21] H. Lord, J. Pawliszyn, J. Chromatogr. A. 885 (2000) 153-193.
- [22] A. L. P. Valente, F. Augusto, Química Nova 23 (2000) 523-530.
- [23] J. Pawliszyn, Solid Phase Microextraction, theory and practice, Wiley-VCH, New York, 1997.
- [24] D. Louch, S. Motlagh, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 64 (1992) 1187-1189.
- [25] Z. Zhang, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 67 (1995) 34-43.
- [26] A. Penãver, E. Pocurull, F. Borrull, R. M. Marcé, Trends in Analytical Chemistry 18 (1999) 557.
- [27] L. Pillonel, J. O. Bosset, R. Tabacchi, Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 35 (2002) 1-14.
- [28] R. L. Dutra, Desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação de zinco (II) em plasma, eritrócitos e urina de 24 horas por espectrometria de absorção atômica em chama e posterior correlação com atividade física e dislipidemia usando análise quimiométrica, Departamento de Química, Tese de Doutorado em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- [29] E. Martendal, Aplicação de Planejamento Fatorial Fracionário e Box-Behnken para Otimização de Extração com Microgota para Determinação de Tricloroanisol e Tribromoanisol de Amostras de Vinho por Cromatografia a Gás, Departamento de Química, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.
- [30] R. E. B. Bruns, I. S. Scarminio, B. d. Barros Neto, Planejamento e Otimização de Experimentos, ed. Unicamp, Campinas - S.P., 1995.
- [31] T. Lundstedt, E. Seifert, L. Abramo, B. Thelin, A. Nystrom, J. Pettersen, R. Bergam, Chemon. Intell. Lab. Syst. 42 (1998) 3-40.
- [32] B. B. Neto, I. S. Scarminio, R. E. B. Bruns, Como fazer experimentos, Pesquisa e desenvolvimento na Ciência e na indústria, Ed. Unicamp, Campinas, 2001.
- [33] A. A. Morales, La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica, Zaragoza: Acribia, 1994.
- [34] R. Causon, J. Chromatogr. B 689 (1997) 175-180.
- [35] J. McMurry, Química Orgânica, Thomson, São Paulo, 2005.
- [36] R. Castro, R. Natera, P. Benitez, C. G. Barroso, Analytica Chimica Acta 513 (2004) 141-150.

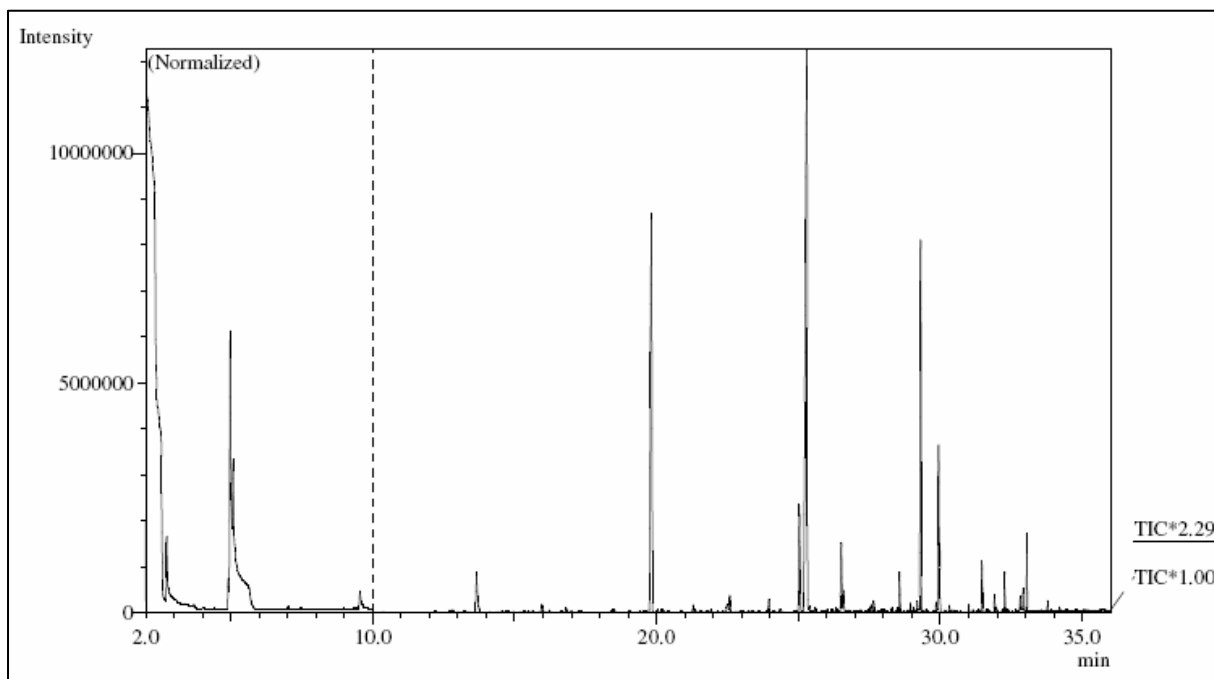
- [37] M. Riu-Aumatell, M. Castellari, E. Lopez-Tamames, S. Galassi, S. Buxaderas, *Food Chemistry* 87 (2004) 627-637.
- [38] J. C. R. Demyttenaere, J. I. S. Martínez, R. Verhe, P. Sandra, *Journal of Chromatography A*, 985 (2003) 221-232.
- [39] S. A. G. F. Angelino, *Volatile compounds in foods and beverages*, Marcel Dekker, New York, 1991.

7. ANEXOS

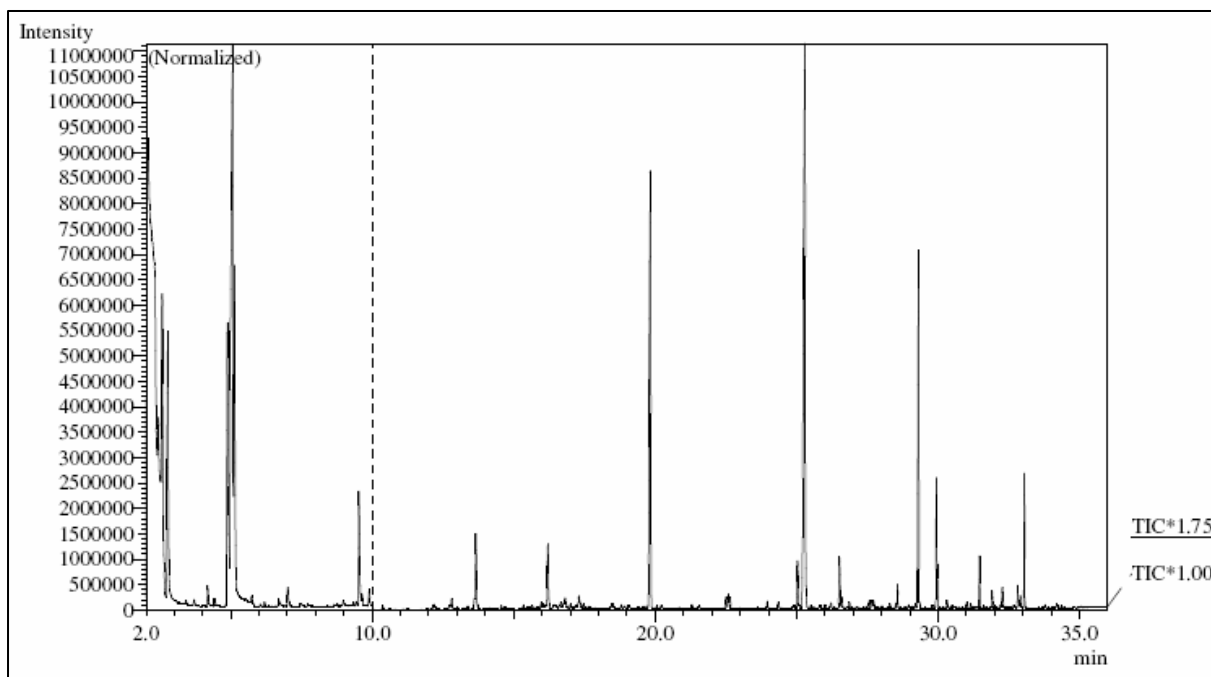
As análises foram feitas por HS-SPME-GC-MS com o auxílio de fibra PDMS. E as amostras não foram diluídas.



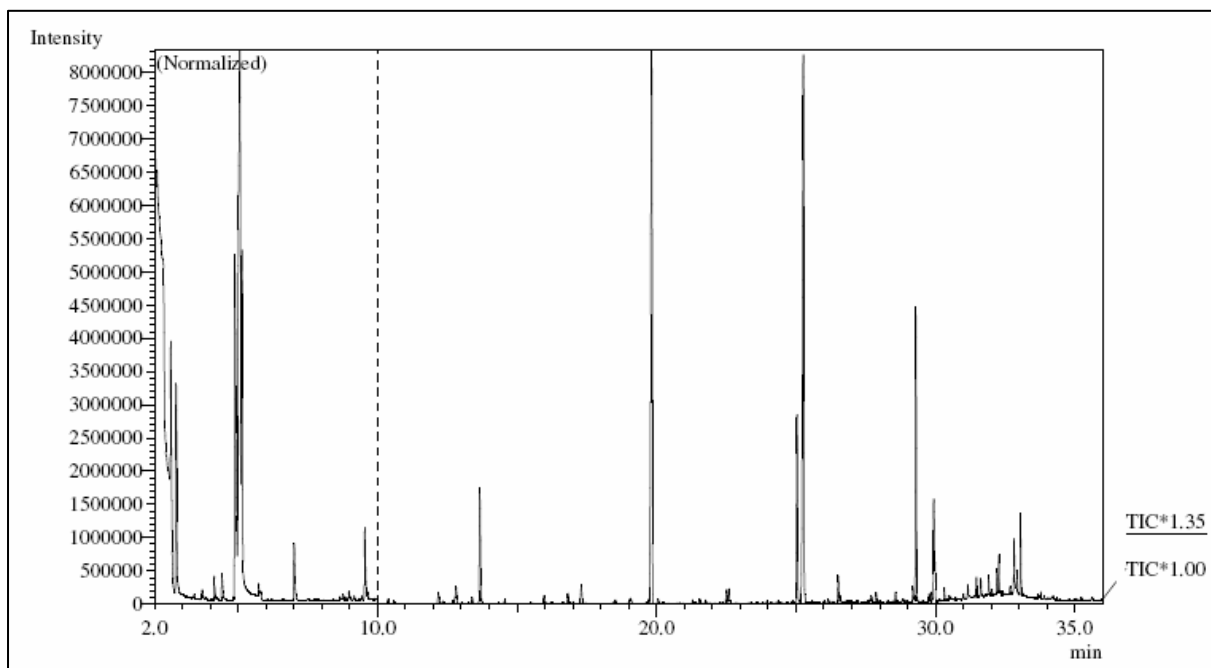
Amostra 01 – Armazém Vieira



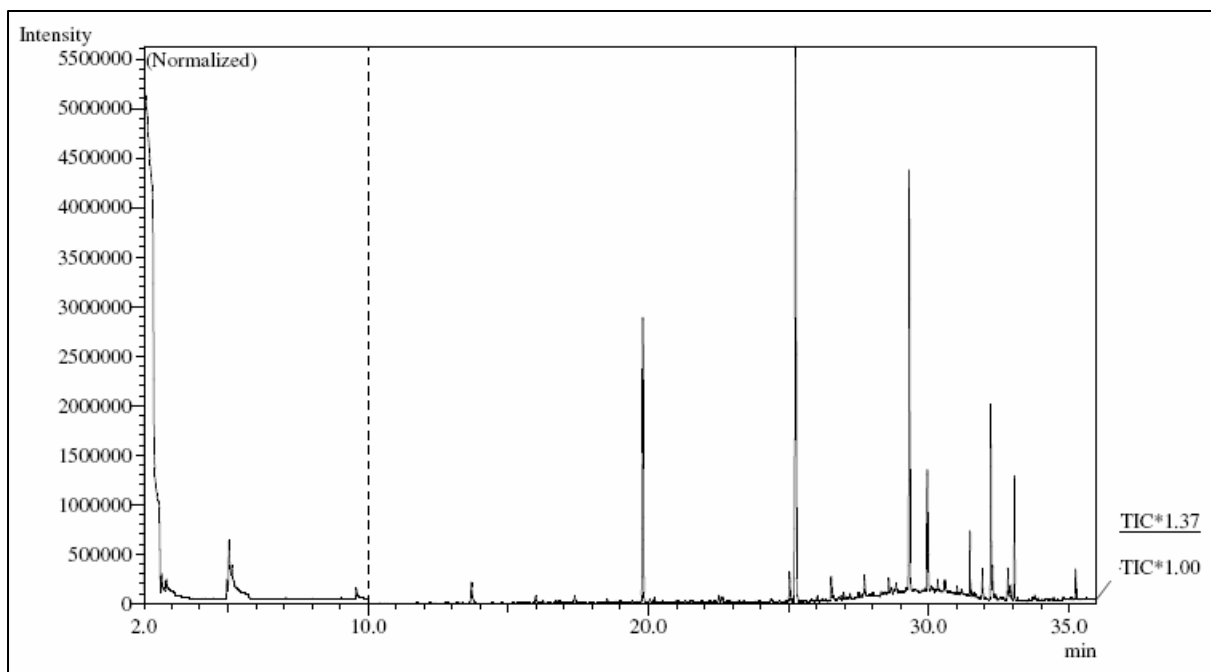
Amostra 02 – Sagatiba



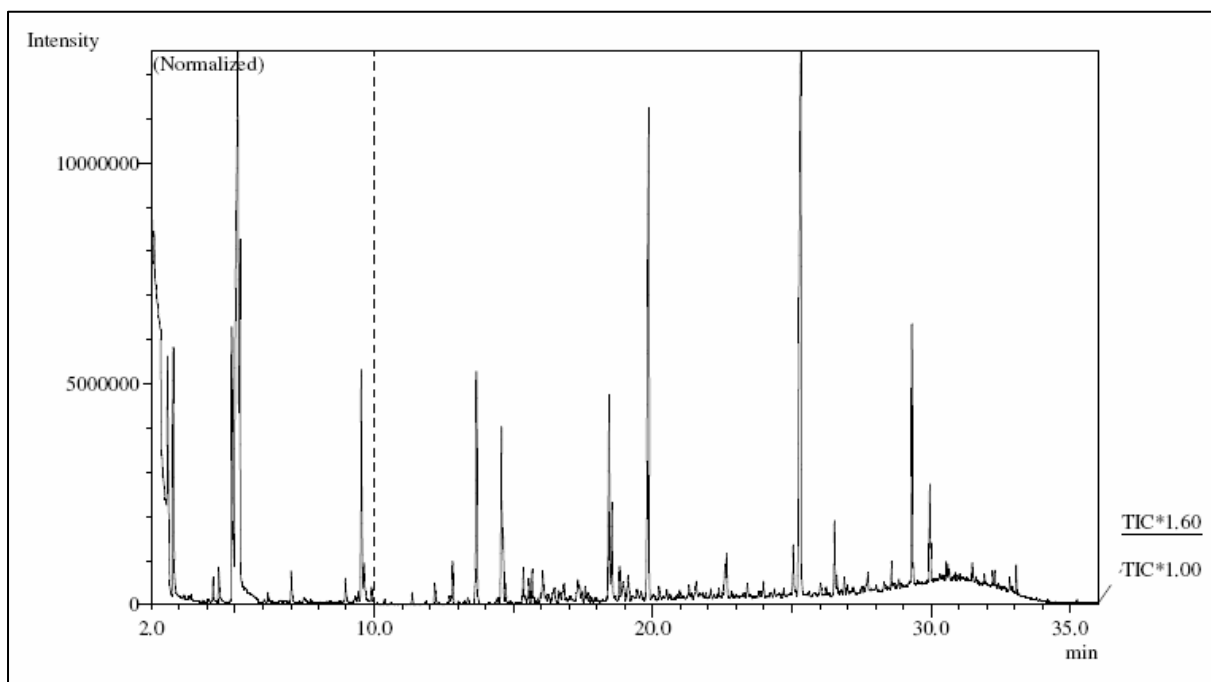
Amostra 03 – Pitú



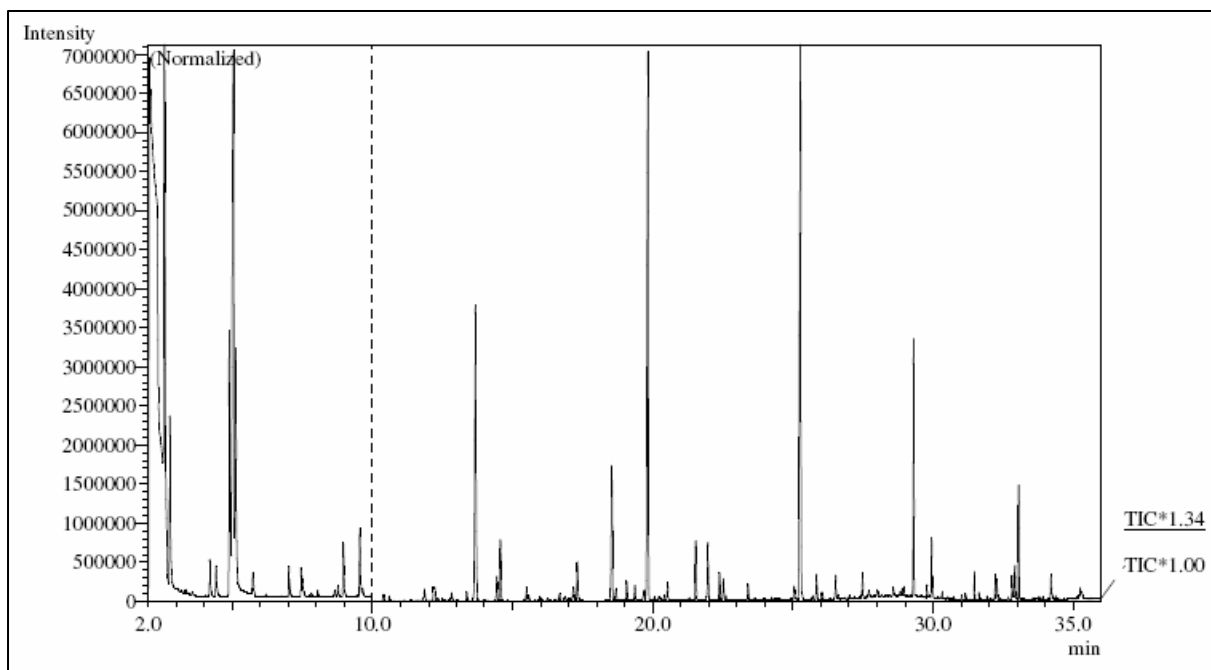
Amostra 04 – Tatuzinho



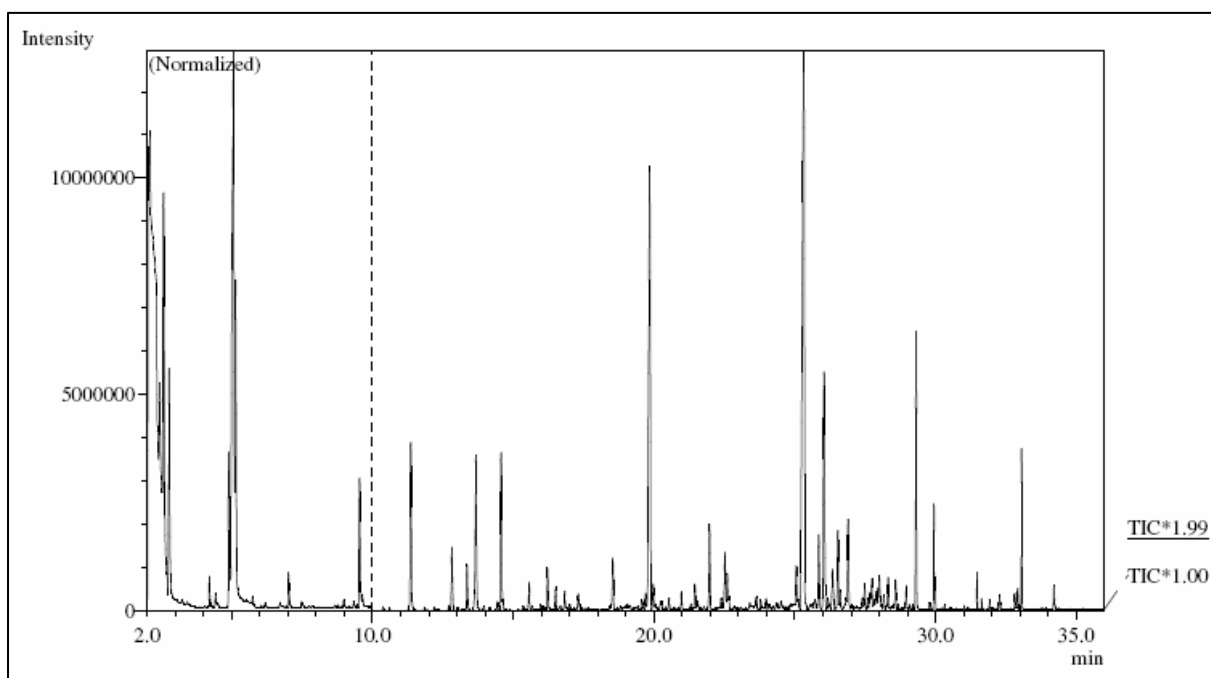
Amostra 05 – Pirassununga



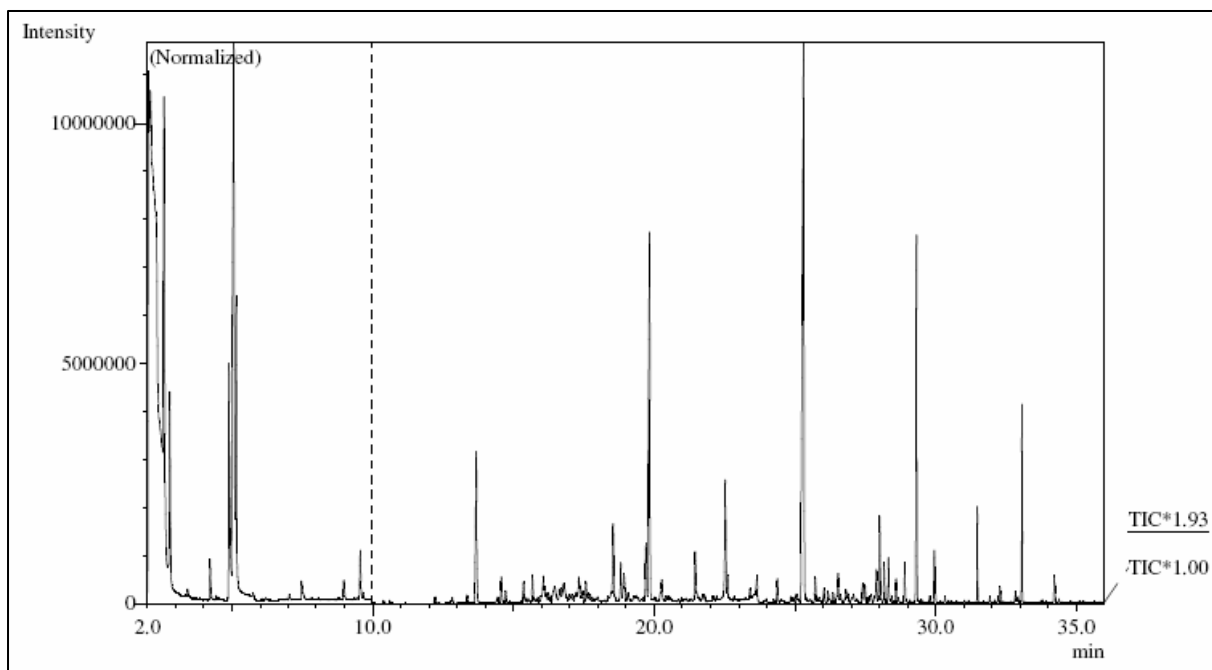
Amostra 06 – Pingo de Ouro



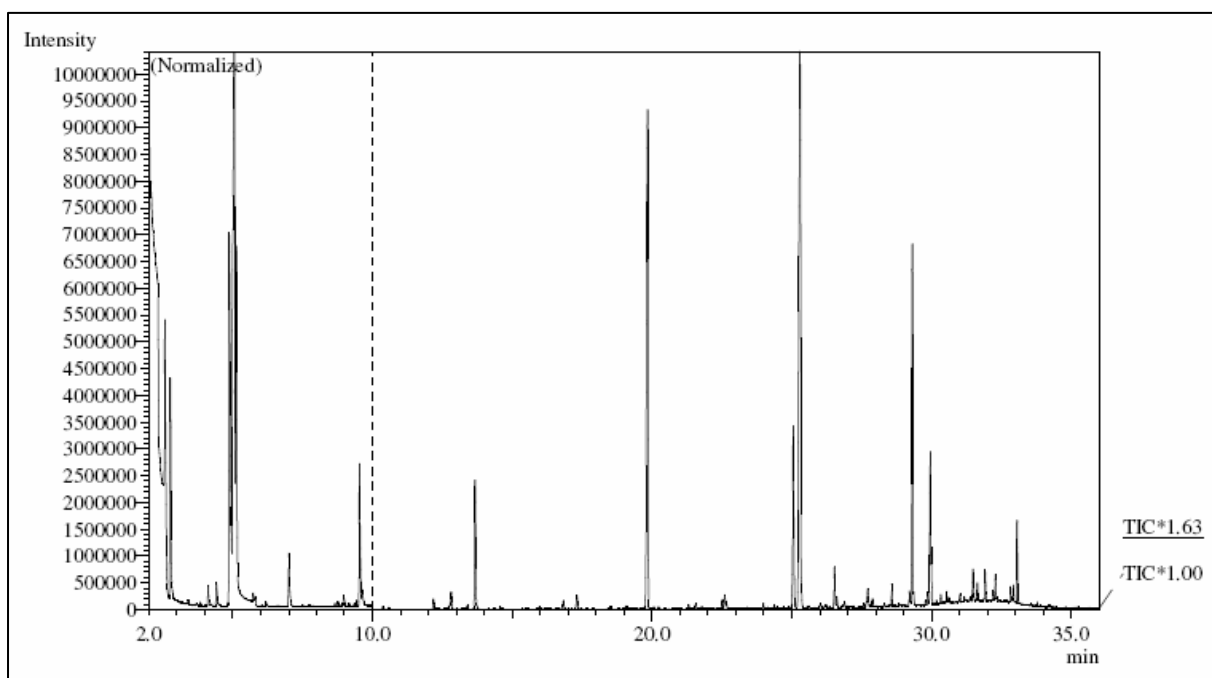
Amostra 07 – A Praiana (2)



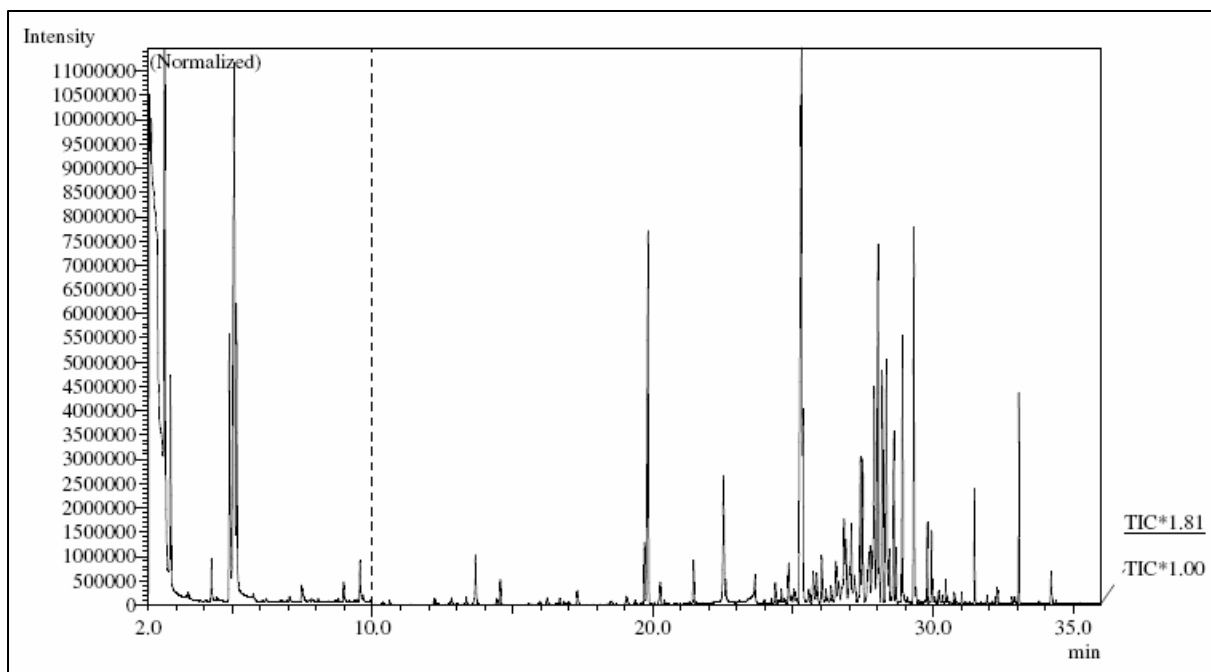
Amostra 08 – A Praiana



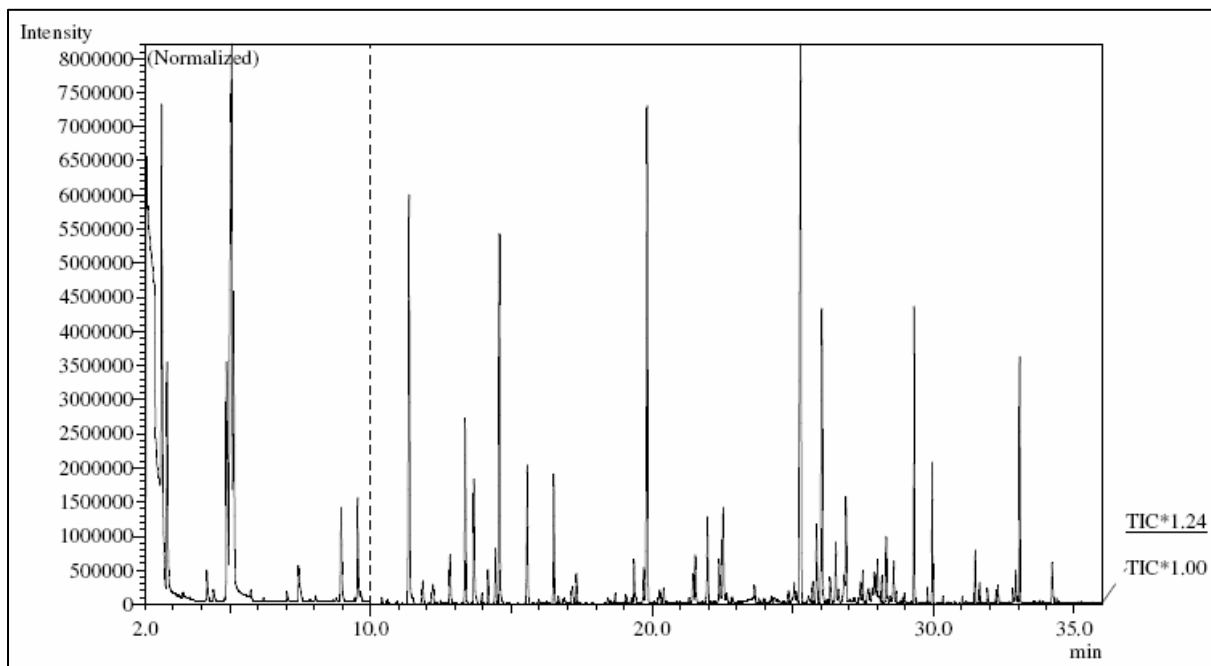
Amostra 9 - Seleta



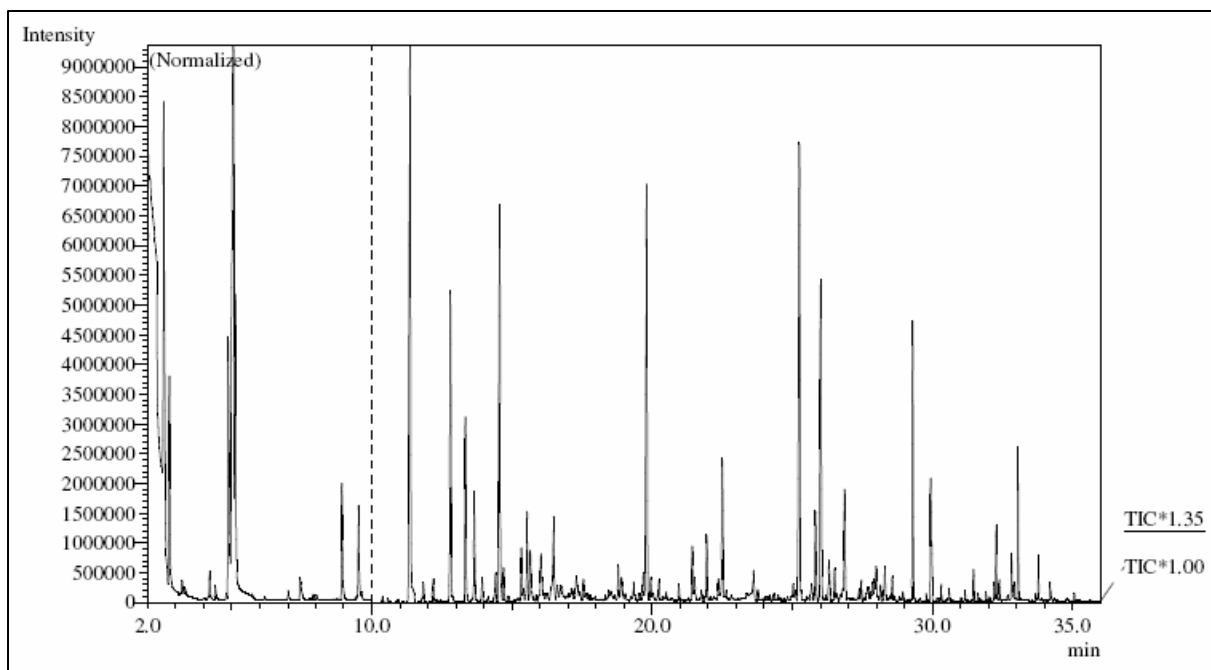
Amostra 10 - 3 Fazendas



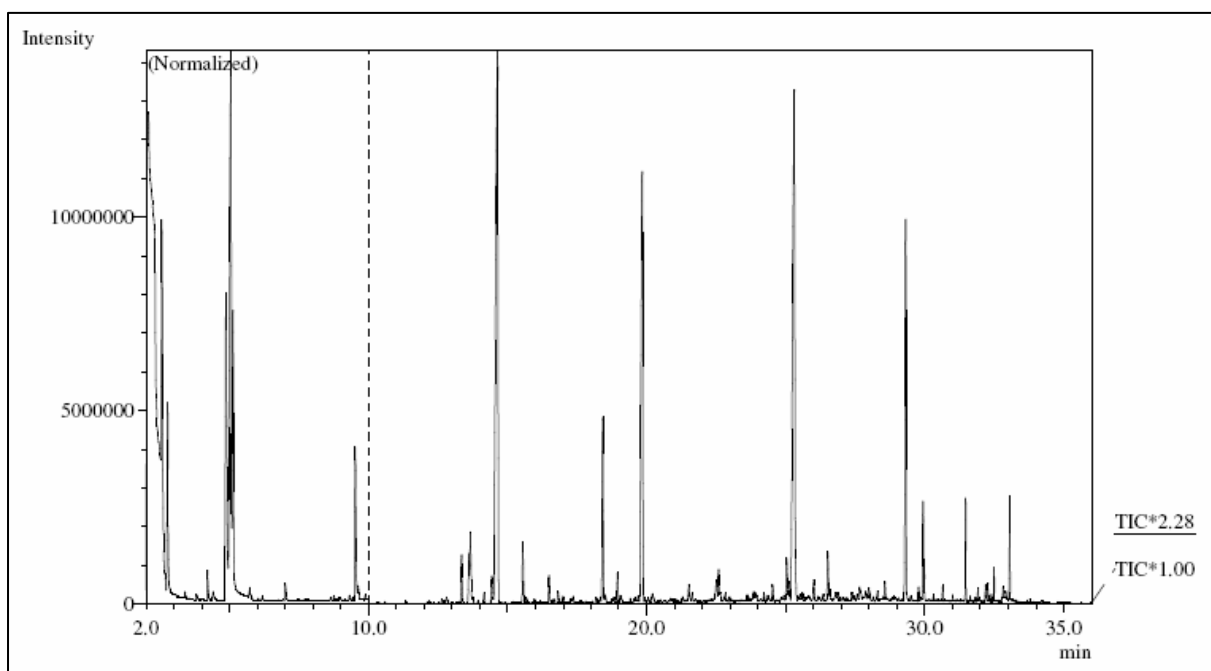
Amostra 11 – Boazinha



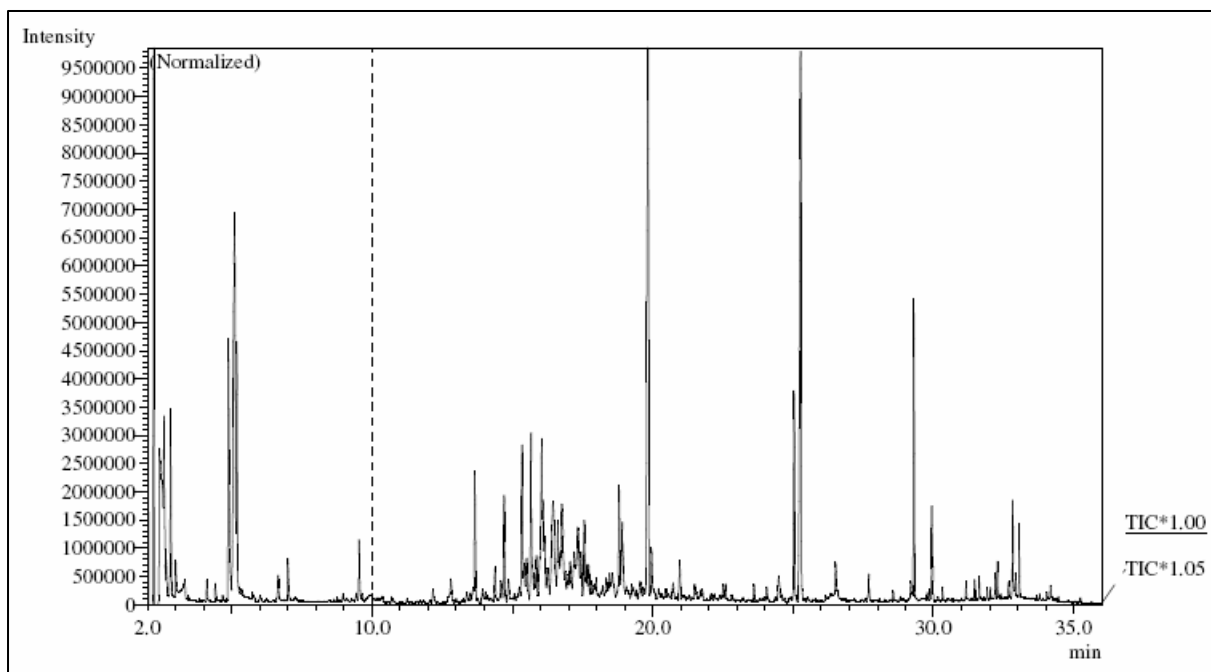
Amostra 12 – Box 32



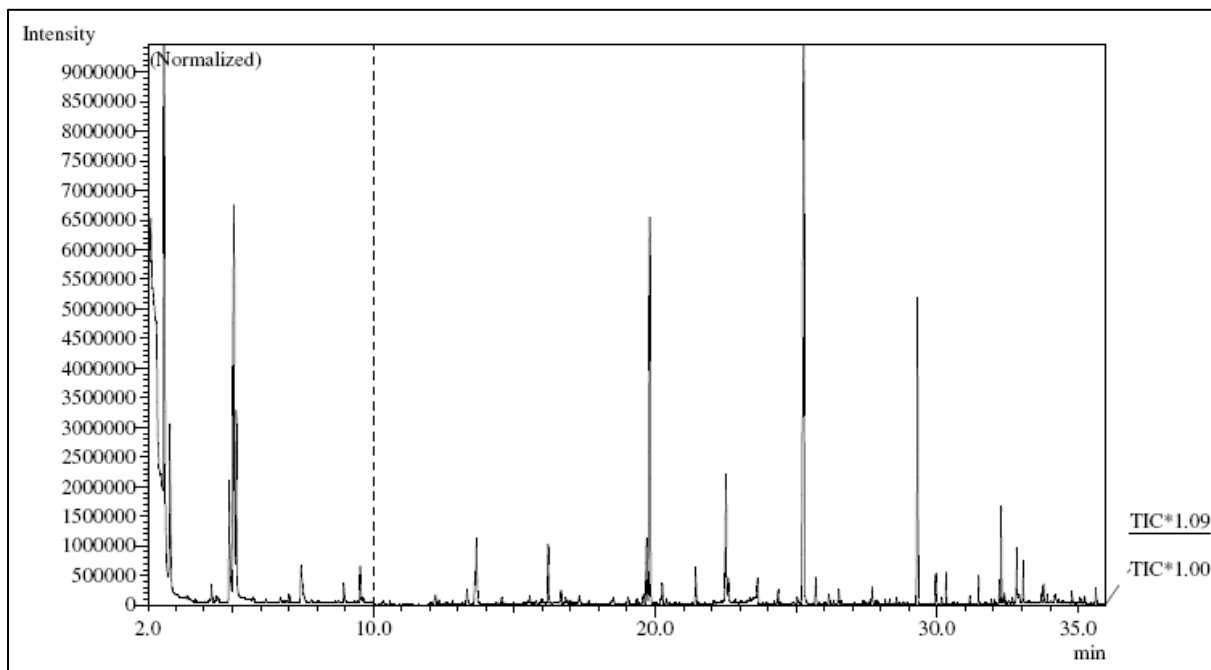
Amostra 13 – Spézia N°1



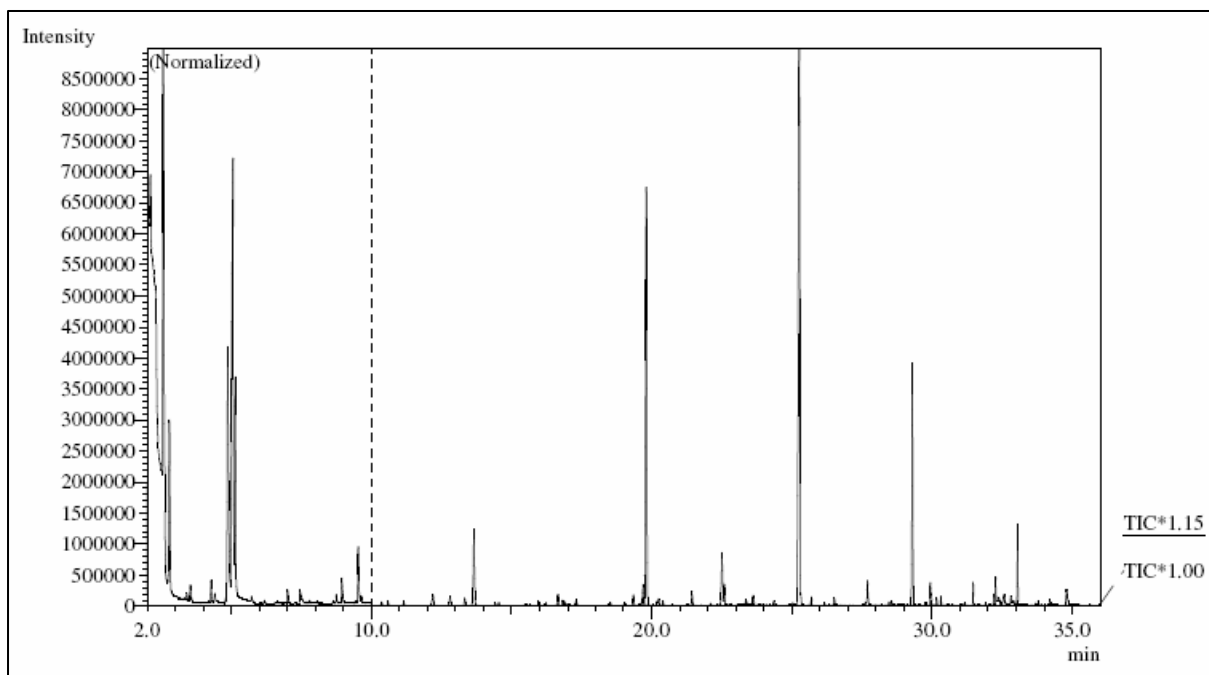
Amostra 14 – Ypióca



Amostra 15 – Velho Barreiro



Amostra 16 – salinas



Amostra 17 – Central de Minas

A Tabela a seguir traz alguns dos principais compostos encontrados em cada uma das 17 amostras, bem como os seus tempos de retenção (T_R). As identificações foram feitas a partir da biblioteca NIST Mass Espectral Database 2.0, com probabilidade mínima de 95%.

Tabela: Principais compostos identificados por HS-SPME-GC-MS com fibra PDMS em 17 amostras de cachaças.

| Nome do analito encontrado | Amostras | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 |
|---|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R |
| sec-Butanol | - | - | 2.442 | - | - | - | - | - | 2.446 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ethyl Acetate | 2.578 | 2.578 | 2.576 | 2.584 | 2.642 | 2.586 | 2.583 | 2.583 | 2.586 | 2.583 | 2.585 | 2.581 | 2.579 | 2.573 | 2.587 | 2.578 | 2.577 | |
| 2-Methyl-1-propanol | 2.779 | 2.739 | 2.772 | 2.774 | 2.809 | 2.787 | 2.775 | 2.778 | 2.793 | 2.771 | 2.795 | 2.775 | 2.779 | 2.777 | 2.825 | 2.789 | 2.795 | |
| Cyclohexane | - | - | - | - | - | - | - | - | 3.239 | - | - | - | - | 3.232 | - | - | - | 3.219 |
| Diethoxymethane | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 3.543 |
| Isooctane | 3.700 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Dimethylsilanediol | 4.206 | - | 4.182 | 4.144 | - | 4.215 | 4.197 | 4.208 | 4.224 | 4.120 | 4.258 | 4.194 | 4.215 | 4.216 | - | 4.257 | 4.281 | |
| Ethyl propanoate | 4.403 | - | 4.421 | 4.417 | - | 4.418 | 4.420 | 4.425 | 4.437 | 4.418 | 4.437 | 4.426 | 4.416 | 4.411 | 4.411 | 4.416 | 4.411 | |
| Ethyl lactate | 4.878 | 4.911 | 4.882 | 4.885 | 4.968 | 4.893 | 4.895 | 4.900 | 4.896 | 4.886 | 4.894 | 4.894 | 4.883 | 4.875 | 4.884 | 4.886 | 4.877 | |
| Isopentyl alcohol | 5.064 | 4.977 | 5.059 | 5.057 | 5.038 | 5.105 | 5.038 | 5.067 | 5.068 | 5.058 | 5.072 | 5.065 | 5.061 | 5.048 | 5.107 | 5.057 | 5.063 | |
| 2-Methyl-1-butanol | 5.136 | 5.077 | 5.133 | 5.132 | 5.144 | 5.171 | 5.122 | 5.141 | 5.146 | 5.134 | 5.150 | 5.139 | 5.134 | 5.126 | 5.180 | 5.135 | 5.141 | |
| Ethyl isobutanoate | - | - | - | - | - | - | 5.738 | - | - | - | - | - | - | - | - | 6.656 | - | - |
| Ethyl butanoate | 6.999 | - | 7.015 | 7.005 | - | 7.019 | 7.021 | 7.018 | - | 7.011 | - | - | - | 7.007 | 7.001 | - | 7.009 | |
| Ethyl lactate | 7.475 | 7.454 | 7.500 | - | - | 7.491 | 7.454 | 7.489 | 7.469 | 7.517 | 7.473 | 7.445 | 7.442 | 7.508 | 7.716 | 7.437 | 7.458 | |
| Ethyl iso-pentanoate | 8.741 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 1,1-Diethoxy-2-methylpropane | 8.948 | 8.993 | 8.974 | 8.970 | 9.023 | 8.967 | 8.960 | 8.981 | 8.972 | 8.976 | 8.970 | 8.953 | 8.935 | 8.969 | 8.959 | 8.949 | 8.947 | |
| Isoamyl acetate | 9.519 | 9.551 | 9.534 | 9.540 | 9.583 | 9.537 | 9.551 | 9.543 | 9.555 | 9.541 | 9.556 | 9.544 | 9.527 | 9.524 | 9.537 | 9.537 | 9.534 | |
| 2-Methylbutyl acetate | 9.620 | - | - | - | - | 9.633 | - | - | - | 9.641 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| R-alpha-Pinene | - | - | - | - | - | 11.36 | 11.36 | 11.36 | - | - | - | 11.36 | 11.36 | 11.35 | - | - | - | - |
| Camphene | - | - | - | - | - | 11.86 | 11.86 | 11.86 | - | - | - | 11.85 | 11.83 | 11.84 | - | - | - | - |
| 1,1-Diethoxypentane | - | 12.18 | 12.17 | 12.17 | 12.20 | 12.17 | 12.18 | 12.18 | 12.22 | 12.18 | 12.22 | 12.21 | 12.19 | 12.17 | 12.16 | 12.20 | 12.20 | |
| L-beta-pinene | - | - | - | - | - | 12.82 | - | 12.82 | - | - | - | 12.82 | 12.80 | - | - | - | - | - |
| beta.-Myrcene | - | - | - | - | - | 13.36 | 13.36 | 13.36 | - | - | - | 13.36 | 13.34 | 13.34 | - | - | - | - |
| Ethyl caproate | - | 13.65 | 13.66 | 13.66 | 13.68 | 13.67 | 13.67 | 13.67 | 13.67 | 13.67 | 13.67 | 13.67 | 13.65 | 13.66 | 13.66 | 13.65 | 13.65 | |
| 3-Carene | - | - | - | - | - | - | - | 13.95 | - | - | - | 13.95 | 13.93 | 13.94 | - | - | - | - |
| 4-Carene | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 14.17 | - | 14.15 | - | - | - | - |
| o-Isopropyltoluene | - | - | 14.42 | - | - | 14.43 | 14.43 | 14.44 | 14.44 | 14.44 | 14.43 | 14.43 | 14.41 | 14.43 | 14.42 | 14.42 | 14.42 | |
| D-Limonene | - | 14.55 | - | 14.56 | - | 14.57 | 14.56 | 14.57 | 14.57 | 14.57 | 14.56 | 14.57 | 14.56 | 14.64 | 14.55 | 14.55 | 14.55 | |
| 3-Methyl-5-propylnonane | - | 14.70 | 14.71 | - | - | 14.72 | - | 14.72 | 14.72 | - | - | - | 14.70 | - | 14.70 | 14.69 | - | |
| 5-Ethyl-2,2,3-trimethylheptane | - | 15.34 | 15.34 | - | - | 15.35 | - | 15.35 | 15.35 | - | - | - | 15.33 | 15.47 | 15.34 | 15.32 | - | |
| 2,2-Dimethyl-3-ethylpentane | - | 15.34 | 15.34 | - | - | 15.43 | - | 15.35 | 15.43 | - | - | - | 15.41 | 15.47 | 15.41 | 15.32 | - | |
| 1-Methyl-4-isopropyl-1,4-cyclohexadiene | - | - | - | - | - | 15.56 | - | 15.56 | - | - | - | 15.56 | 15.54 | 15.54 | - | 15.54 | - | |

Continua

Continuação

| Nome do analito encontrado | Amostras | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 |
|--|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R |
| 3,6-Dimethylundecane | - | 15.66 | 15.66 | - | - | 15.67 | - | 15.67 | 15.67 | - | - | 15.57 | 15.65 | 15.47 | 15.66 | 15.77 | - | - |
| 1-Octanol | - | 15.95 | - | - | - | - | - | - | 15.98 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 1,1,3-Triethoxypropane | - | - | 16.20 | - | - | - | - | 16.21 | - | - | - | - | - | - | - | - | 16.20 | - |
| 3,7-Dimethylnonane | - | - | 16.39 | - | - | 16.40 | - | - | 16.40 | - | 16.83 | - | 16.38 | 16.81 | 16.39 | 16.39 | - | - |
| 2-Carene | - | - | - | - | - | 16.50 | 16.50 | 16.50 | - | - | - | 16.50 | 16.48 | 16.49 | - | - | - | - |
| 5-Butylnonane | - | - | - | - | - | 16.63 | - | 16.63 | 16.62 | - | - | - | 16.61 | - | - | 16.88 | - | - |
| Ethyl heptanoate | - | - | 16.81 | - | - | 16.82 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Phenethyl alcohol | - | - | 17.30 | 17.30 | 17.32 | 17.31 | 17.31 | 17.31 | 17.31 | 17.31 | 17.31 | 17.31 | 17.29 | 17.30 | 17.31 | 17.30 | 17.30 | 17.30 |
| 2,2,6-Trimethyldecane | - | 17.36 | 17.56 | - | 17.37 | 17.57 | - | 17.57 | 17.57 | - | - | - | 17.55 | 17.36 | 17.56 | 17.34 | - | - |
| 4-Methyldodecane | - | - | 18.34 | - | - | - | - | 18.65 | 18.35 | - | - | - | 18.33 | - | 18.34 | 18.33 | - | - |
| 2-Ethylhexyl acetate | - | - | - | - | - | 18.43 | - | - | - | - | - | - | - | 18.42 | - | - | - | - |
| 2,2-Dimethyltetradecane | - | - | 18.91 | - | - | 18.92 | - | 18.92 | 18.92 | - | - | - | 18.90 | - | 18.91 | - | - | - |
| Diethyl ester of butanedioic acid | - | - | - | - | - | 19.37 | 19.36 | 19.37 | 19.36 | - | 19.36 | 19.36 | 19.34 | - | - | 19.34 | 19.34 | - |
| 3-Ethyl-3,5,5-trimethylcyclohexanone | - | - | 19.42 | - | 19.54 | - | - | 19.56 | - | 19.57 | - | - | 19.54 | - | 19.54 | 19.44 | - | - |
| Ethyl caprylate | 19.84 | 19.82 | 19.82 | 19.82 | 19.80 | 19.85 | 19.82 | 19.85 | 19.83 | 19.84 | 19.83 | 19.82 | 19.80 | 19.83 | 19.82 | 19.80 | 19.80 | 19.80 |
| 2,3-dicyclohexyl-butane | - | - | 20.21 | 20.21 | - | - | - | 19.97 | - | 20.22 | - | - | 19.95 | - | 19.95 | - | - | - |
| 2-Methyl-1-decanol | - | - | - | - | - | 20.22 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 1,1,6-Trimethyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene | 20.24 | 20.25 | 20.26 | 20.26 | - | - | 20.26 | 20.27 | 20.26 | 20.27 | 20.26 | 20.26 | 20.24 | 20.25 | 20.25 | 20.25 | 20.25 | 20.25 |
| Cinnamaldehyde | - | - | - | - | - | - | 20.52 | 20.53 | - | - | - | 20.53 | 20.50 | - | - | - | - | - |
| 5-Hydroxymethylfurfural | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 20.72 | - | - |
| (4-Methylpentyl)cyclohexane | - | - | 20.96 | 20.96 | 20.96 | 20.97 | - | 20.97 | - | 20.97 | 20.97 | 20.97 | 20.95 | 20.95 | 20.95 | 20.95 | 20.95 | - |
| 1,1,5,6-Tetramethylindane | 21.43 | - | - | - | - | - | - | 21.45 | 21.45 | 21.45 | 21.45 | 21.45 | 21.43 | 21.43 | 21.43 | 21.43 | 21.43 | 21.43 |
| trans-Cinnamaldehyde | - | - | - | - | - | - | 21.96 | 21.97 | - | - | - | 21.97 | 21.95 | - | - | - | - | - |
| p-Propenylphenyl methyl ether | - | - | - | - | - | 22.38 | 22.38 | 22.38 | - | - | - | 22.38 | 22.36 | - | - | - | - | - |
| 1,1,6-Trimethyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene | 22.50 | 22.50 | 22.51 | 22.51 | 22.51 | - | 22.52 | 22.52 | 22.52 | 22.52 | 22.52 | 22.52 | 22.50 | 22.50 | 22.50 | 22.50 | 22.50 | 22.50 |
| Ethyl nonanoate | - | 22.58 | - | 22.59 | - | 22.60 | - | 22.60 | 22.60 | 22.60 | 22.60 | - | - | 22.58 | 22.59 | 22.58 | 22.58 | - |
| Tridecane | - | - | - | - | - | 22.38 | 22.65 | - | - | - | - | 22.66 | 22.64 | 22.78 | - | 23.06 | 22.64 | - |
| 1,1,5,6-Tetramethylindane | 23.61 | 23.62 | 23.63 | 23.63 | - | 23.53 | 23.64 | 23.64 | 23.64 | 23.64 | 23.64 | 23.64 | 23.62 | 23.62 | 23.62 | 23.62 | 23.62 | 23.62 |
| 3-Isopropenyl-1-isopropyl-4-methyl-4-vinyl-1-cyclohexene | - | - | - | - | - | - | - | 23.79 | - | - | 23.79 | 23.79 | 23.77 | 23.77 | - | - | - | - |
| Isobutyl octanoate | - | 23.96 | - | - | - | - | - | 23.98 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| (+)-Cyclosativene | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 24.59 | - | - | - | - | - | - | - |
| (-)-.alpha.-Copaene | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 24.84 | 24.84 | - | - | - | - | - | - |
| Ethyl 9-decenoate | - | 25.03 | 25.03 | 25.03 | 25.03 | 25.04 | 25.04 | 25.05 | 25.04 | 25.05 | - | 25.04 | 25.02 | 25.03 | 25.03 | 25.02 | 25.02 | 25.02 |

Continua

Continuação

| Nome do analito encontrado | Amostras | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 |
|---|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R |
| Ethyl caprate | | 25.30 | 25.29 | 25.29 | 25.26 | 25.25 | 25.31 | 25.26 | 25.32 | 25.30 | 25.29 | 25.30 | 25.27 | 25.25 | 25.31 | 25.26 | 25.26 | 25.26 |
| Cedr-8-ene | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 25.56 | - | - | - | - | - | - |
| alpha.-Cedrene | | - | 25.83 | 25.83 | 25.83 | 25.83 | 25.40 | 25.84 | 25.85 | 25.84 | 25.84 | 25.84 | 25.84 | 25.82 | 25.83 | 26.00 | 25.82 | - |
| Bicyclo[7.2.0]undec-4-ene | | - | 26.00 | 26.00 | 26.00 | 26.01 | - | 25.70 | 26.04 | 26.02 | 26.02 | 26.02 | 26.03 | 26.01 | 26.00 | - | - | - |
| Thujopsene | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 26.33 | 26.31 | - | - | - | - |
| alpha.-Bergamotene | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 26.34 | - | - | - |
| Isoamyl caprylate | | - | 26.51 | 26.51 | 26.51 | 26.52 | 26.53 | 26.52 | 26.53 | 26.53 | 26.53 | 26.53 | 26.53 | 26.51 | 26.51 | 26.51 | 26.51 | 26.51 |
| beta.-Farnesene | | - | 26.80 | 26.80 | 26.80 | - | 26.99 | - | 26.82 | 26.82 | 26.82 | 26.82 | 26.82 | 26.80 | 26.80 | - | - | - |
| 1,4,7,-Cycloundecatriene, 1,5,9,9-tetramethyl-, Z,Z,Z- | | - | - | 26.87 | - | - | 26.89 | - | 26.89 | 26.89 | 26.89 | 26.89 | 26.88 | 26.86 | 26.87 | - | - | - |
| L-alloaromadendrene | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 27.08 | - | - | - | - | - | - |
| 1-Isopropyl-7-methyl-4-methylene-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydronaphthalene | | 27.38 | 27.38 | 27.39 | 27.46 | - | - | 27.40 | 27.40 | 27.40 | 27.48 | 27.41 | 27.40 | 27.38 | 27.39 | - | 27.38 | - |
| Curcumene | | 27.46 | 27.46 | - | - | - | - | 27.48 | 27.48 | 27.48 | - | 27.49 | 27.48 | 27.46 | - | - | 27.47 | - |
| Ethyl undecanoate | | - | 27.65 | - | - | - | - | - | 27.66 | - | - | - | - | - | 27.65 | - | - | - |
| alpha.-Amorphene | | - | 27.88 | 27.88 | 27.47 | - | 27.48 | 27.89 | 27.89 | 27.89 | 27.48 | 27.90 | 27.89 | 27.87 | 27.88 | 27.46 | 27.63 | - |
| alpha.-Farnesene | | - | 27.94 | 27.99 | 27.99 | 28.00 | 27.48 | 28.00 | 27.95 | 28.00 | 27.95 | 28.03 | 27.95 | 27.94 | 27.94 | 27.99 | 27.88 | - |
| beta.-Bisabolene | | - | 27.99 | 27.99 | 27.99 | - | - | 28.00 | 28.00 | 28.01 | 28.00 | 28.03 | 28.00 | 27.99 | 27.99 | - | 27.99 | 27.99 |
| gamma.-Muurokene | | - | 28.30 | 28.15 | 28.31 | - | - | 27.89 | 28.16 | 28.16 | - | - | 28.16 | 28.14 | 28.15 | - | 27.88 | - |
| delta.-Cadinene | | 28.30 | 28.30 | 28.30 | - | - | - | 28.16 | 28.31 | 28.31 | 28.31 | 28.33 | 28.31 | 28.30 | 28.30 | - | 28.30 | - |
| Pentadecylcyclohexane | | - | - | - | - | 28.67 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| (6E)-3,7,11-Trimethyl-1,6,10-dodecatrien-3-ol | | - | - | - | - | - | - | - | - | 28.89 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ethyl n-dodecanoate | | 29.30 | 29.30 | 29.30 | 29.30 | 29.30 | 29.31 | 29.30 | 29.31 | 29.31 | 29.31 | 29.31 | 29.30 | 29.29 | 29.31 | 29.30 | 29.30 | 29.29 |
| Isopentyl decanoate | | - | 29.94 | 29.94 | 29.94 | 29.94 | 29.95 | 29.94 | 29.95 | 29.94 | 29.95 | 29.94 | 29.94 | 29.94 | 29.94 | 29.94 | 29.94 | 29.94 |
| 4-Octadecylmorpholine | | - | 30.31 | 30.32 | 30.32 | 30.32 | 30.32 | 30.32 | 30.32 | 30.32 | 30.33 | 30.32 | 30.32 | 30.31 | 30.31 | 30.32 | 30.31 | 30.31 |
| Heptadecane | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 30.54 | - | - | - | - | - | - | - |
| Tetradecanoic acid | | - | - | - | 31.16 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 31.16 | - | - |
| Ethyl tetradecanoate | | - | 31.46 | 31.47 | 31.47 | 31.47 | 31.47 | 31.47 | 31.47 | 31.47 | 31.47 | 31.47 | 31.47 | 31.46 | 31.47 | 31.47 | 31.47 | 31.46 |
| iso-Amyl n-dodecanoate | | - | 31.91 | 31.91 | 31.91 | 31.91 | - | - | 31.99 | - | 31.91 | - | - | - | 31.91 | - | - | - |
| 1-Pentadecanol | | - | - | 32.21 | 32.21 | 32.21 | 32.21 | 32.21 | 32.21 | 32.21 | 32.21 | 32.21 | 32.21 | 32.20 | 32.21 | 32.21 | 32.21 | 32.21 |
| 4-Octadecylmorpholine | | - | 32.27 | 32.27 | 32.27 | 32.27 | 32.27 | 32.28 | 32.28 | 32.27 | 32.28 | 32.28 | 32.28 | 32.27 | 32.27 | 32.27 | 32.27 | 32.27 |
| N,N-Dimethyl-1-nonadecanamine | | - | 32.39 | 32.39 | 32.39 | 32.39 | - | 32.40 | 32.40 | 32.40 | 32.40 | 32.40 | 32.40 | 32.39 | 32.39 | 32.39 | 32.39 | 32.39 |
| Pentadecanoic acid | | - | 32.81 | 32.81 | 32.82 | 32.81 | 32.81 | 32.82 | 32.82 | 32.82 | 32.82 | 32.81 | 32.81 | 32.82 | 32.81 | 32.82 | 32.82 | 32.81 |
| Ethyl 9-hexadecenoate | | - | - | - | - | - | - | 32.92 | 32.92 | - | 32.82 | - | 32.92 | - | - | - | - | - |

Continua

Continuação

| Nome do analito encontrado | Amostras | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 |
|--------------------------------------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R | T_R |
| Ethyl hexadecanoate | | 33.0 | 33.05 | 33.05 | 33.05 | 33.05 | 33.05 | 33.05 | 33.05 | 33.05 | 33.05 | 33.05 | 33.05 | 33.05 | 33.05 | 33.05 | 33.05 | 33.05 |
| Oleic Acid | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 34.03 | - | - |
| Ethyl (9E,12E)-9,12-octadecadienoate | | - | 34.19 | 34.19 | 34.22 | 34.20 | 33.90 | 34.20 | 34.20 | 34.20 | 34.20 | 34.20 | 34.20 | 34.19 | 34.20 | 34.17 | 34.20 | 34.20 |